

**Стратегии холодоустойчивости беспозвоночных****Cold-Hardiness Strategies of Invertebrates**

Обзор посвящен классификации типов холодоустойчивости беспозвоночных животных. В работе рассмотрены классические стратегии холодоустойчивости и их биохимические механизмы, а также обсуждены результаты ряда работ, требующие новых подходов к классификации холодоустойчивости беспозвоночных.

**Ключевые слова:** холодоустойчивость, избегание замерзания, устойчивость к замерзанию, переохлаждение, внутри- и внеклеточная кристаллизация, холодовой шок.

Огляд присвячено класифікації типів холодостійкості безхребетних тварин. В роботі розглянуто класичні стратегії холодостійкості та їх біохімічні механізми, а також обговорено дані низки робіт, які вимагають нових підходів до класифікації холодостійкості безхребетних.

**Ключові слова:** холодостійкість, уникнення замерзання, стійкість до замерзання, переохладження, внутрішньо- та позаклітинна кристалізація, холодовий шок.

The review is devoted to the classification of invertebrates' cold-hardiness types. Classically distinguished strategies of cold-hardiness and their biochemical mechanisms are considered in the research, as well as the data of research results requiring new approaches to invertebrates' cold-hardiness classification are discussed.

**Key words:** cold-hardiness, freeze-avoidance, freeze-tolerance, supercooling, intra- and extracellular crystallization, cold shock.

Большинство наземных беспозвоночных, обитающих в высоких широтах, выживают в зимний период при низкой температуре по одной из двух стратегий: устойчивость к замерзанию либо избегание замерзания путем переохлаждения в зависимости от способности конкретного вида выживать при кристаллизации жидкостей тела [15, 60]. Однако за прошедшее десятилетие появилось много сообщений, на основании которых можно считать такую концепцию упрощенной и не отражающей всего многообразия адаптивных механизмов холодоустойчивости беспозвоночных. В данном обзоре мы сосредоточили внимание на тех фактах, которые требуют пересмотра и уточнения данной концепции.

Холодоустойчивость варьирует не только между видами, но и в пределах одного вида. Так, стратегия выживания жука *Dendroides canadensis* более сложная, поскольку этот вид может ее изменять [35]. Личинок, зимующих под мертвой корой, изучали на протяжении пяти зим (1977–1982 гг.). Зима 1977–1978 и 1978–1979 гг. была очень холодной, следующие две зимы – умеренными, а зима 1981–1982 гг. – такой же холодной, как и две первые. Зимой 1977–1978 и 1978–1979 гг. личинки были устойчивы к замерзанию, содержали нуклеаторы льда и переохлаждались до  $-8...-12^{\circ}\text{C}$ . Кро-

The most of high latitude inhabiting terraneous invertebrates survive in winter under low temperature due to one of two strategies: either freeze-tolerance or freeze-avoidance by supercooling depending on capability of certain species to survive during crystallization of body fluids [15, 60]. However, within the past decade there have appeared many reports, on the base of which this conception might be considered as simplified one and not representing the complete variety of adaptive mechanisms of invertebrates' cold-hardiness. In this review we concentrated the attention to those facts, requiring a revision and refinement of this conception.

Cold-hardiness varies not only among the range of the species, but also within one species. For example, survival strategy of the beetle *Dendroides canadensis* is more complex, because this species can change it [35]. Larvae, overwintering under dead bark were investigated during five winters (1977–1982). In 1977–1978 and 1978–1979 the winters were very cold, the next two ones were moderate and the winter in 1981–1982 was as cold as two first ones. In 1977–1978 and 1978–1979 winters the larvae were freeze-tolerant, contained ice nucleating agents and supercooled down to  $-8...-12^{\circ}\text{C}$ . In addition they contained antifreeze proteins (AFPs). On the other hand larvae collected 1981–1982 winter were sensitive to freezing, supercooled

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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) 373-41-35, 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  
4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

ме того, они содержали антифризные протеины (АФП). Напротив, личинки, собранные зимой 1981–1982 гг., были чувствительны к замерзанию, переохлаждались до  $-26^{\circ}\text{C}$  и проявляли эффект термогистерезиса. По-видимому, факторы окружающей среды не только регулируют синтез полиолов, нуклеаторов и АФП у *D. canadensis*, но и контролируют механизм включения стратегии.

Полное развитие личинок происходит в течение двух и более лет. Поскольку объектом исследования служили только взрослые личинки, все экспериментальные особи пережили по крайней мере одну зиму. Измерение температуры замерзания гемолимфы показало, что “переключение” стратегии происходило на протяжении двух мягких зим, поэтому можно предположить, что условия, при которых личинки выжили в первую зиму, определили стратегию будущей зимовки.

Устойчивые к замерзанию виды часто претерпевают неоднократные циклы замораживания-оттаивания, что увеличивает риск криоповреждений. При исследовании выживаемости устойчивых к замерзанию суб-антарктического жука *Hydromedion sparsutum* и журчалки *Syrphus ribesii* при повторных циклах замораживания-оттаивания были получены неожиданные результаты [9, 11]. Предполагали, что каждая особь будет замерзать в каждом из 10 циклов, однако в конце эксперимента оказалось, что некоторые личинки не замерзли при температуре на  $6-10^{\circ}\text{C}$  ниже точки переохлаждения (ТПО), присущей личинкам в первый день эксперимента. Установлено, что чем ниже “новая” ТПО, тем больше вероятность гибели личинки от замерзания. Очевидно, что после первого замораживания часть особей в популяции снизила свою ТПО, в результате чего вероятность замерзания при последующих экспозициях при низкой температуре уменьшалась. Таким образом, популяция личинок разделилась на две группы: первая всегда замерзала в одном и том же температурном диапазоне и оставалась устойчивой к замерзанию, а вторая замерзала и погибала при гораздо более низких температурах, т. е. поменяла свою стратегию выживания на избегание замерзания путем переохлаждения.

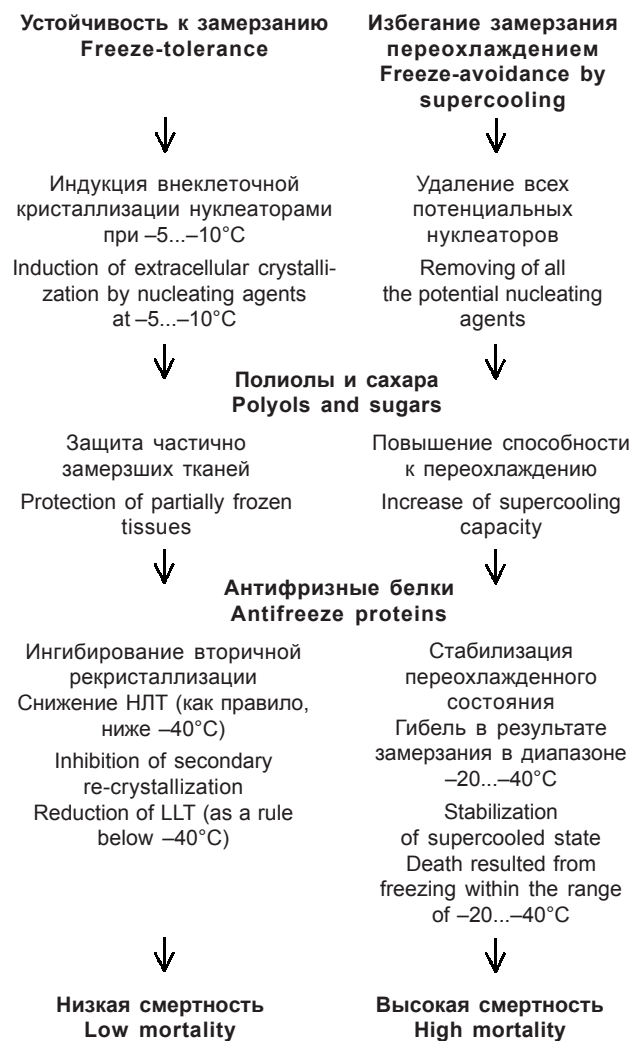
Неизвестно, являются ли такие переключения стратегий общим феноменом для так называемых устойчивых к замерзанию организмов, поскольку классификация на устойчивые к замерзанию и избегающие замерзания виды основана на лабораторных данных. Возможно, что некоторые (или многие) животные используют обе стратегии в зависимости от условий обитания (рисунок).

Традиционно холодоустойчивость характеризуется такими показателями, как ТПО, низшая летальная температура (НЛТ), время (при постоян-

down to  $-26^{\circ}\text{C}$  and manifested a thermohysteresis effect. Evidently, environmental factors do not only regulate the synthesis of polyols, nucleating agents and AFPs in *D. canadensis*, but also control a mechanism of strategy onset.

A complete development of larvae takes two or more years. Since only the mature larvae were the research objects, all the experimental specimens survived at least one winter. Measuring of hemolymph freezing temperature showed that strategy was reorientated during two mild winters, therefore the authors suggest that the conditions under which the larvae survived in the first winter established the future overwintering strategy.

Freeze-tolerant species often undergo multiple freeze-thawing cycles increasing in that way the risk of cryodamage. Investigation of survival of the freeze-tolerant sub-Antarctic beetle *Hydromedion sparsutum* and the syrphid fly *Syrphus ribesii* after repeated cy-



Основные компоненты холодоустойчивости беспозвоночных [9].

Main components of invertebrates' cold-hardiness [9].

ной температуре или температуре за фиксированный промежуток времени), при которых гибнет 50% популяции [6]. В то же время использование ТПО в качестве единственного параметра для описания или сравнения холодоустойчивости насекомых является не вполне адекватным, поскольку гибель и повреждения в результате охлаждения зачастую происходят при отсутствии замерзания жидкостей тела [10]. Способность к переохлаждению может являться результатом не связанных с холодом адаптаций, например устойчивости к обезвоживанию [56]. Кроме того, распределение ТПО имеет бимодальный характер, что, возможно, связано с половым диморфизмом – этот факт редко принимается во внимание в большинстве работ.

### Устойчивость к замерзанию

Считается, что для выживания биологического объекта замерзание должно быть ограничено внеклеточным пространством, поскольку внутриклеточная кристаллизация является летальной. После кристаллизации смертность продолжает зависеть от температуры и расти по мере ее снижения (все виды имеют НЛТ) и увеличения длительности экспозиции организма при низких температурах в замёрзшем состоянии [65, 76].

Организмы, устойчивые к замерзанию, можно разделить на две подгруппы: устойчивые к замерзанию в течение всего года и приобретающие устойчивость к замерзанию в зависимости от сезона [69].

Устойчивые к замерзанию артроподы обладают тремя основными биохимическими компонентами, которые обеспечивают холодоустойчивость: нуклеаторы льда, полиолы и сахара, АФП.

*Нуклеаторы льда.* Многие устойчивые к замерзанию насекомые обладают зимой нуклеаторами льда, которые ограничивают способность к переохлаждению и обеспечивают защитную внеклеточную кристаллизацию при высоких субнулевых температурах [28, 29, 75]. Другие виды не обладают активными нуклеаторами (либо обладают ими в незначительном количестве) и переохлаждаются до  $-50...-60^{\circ}\text{C}$ , но при этом остаются устойчивыми к замерзанию при таких низких температурах.

Нуклеаторы льда в гемолимфе обнаружены у жесткокрылых, перепончатокрылых и двукрылых [75]. Кроме того, нуклеирующие агенты (НА) идентифицированы у тихоходок *Adorybiotus coronifera* [70] и моллюсков *Melampus bidentatus* [33] и *Mytilus edulis* [47].

Нуклеаторы беспозвоночных имеют белковую природу [28, 53, 74, 77]. В данной работе мы не будем подробно характеризовать эти соединения, так

cles of freeze-thawing revealed the surprising results [9, 11]. It was suggested that each insect would undergo freezing in each of 10 cycles, however, at the end of experiment it was found that some larvae avoided freezing under the temperature of  $6-10^{\circ}\text{C}$  below the supercooling point (SCP), which was typical for larvae on the 1<sup>st</sup> experimental day. It was established that the lower was “new” SCP, the higher was probability of larva death after freezing. Evidently after the first freezing a part of insects in population reduced their SCP, that resulted in decreasing of freezing probability at the following low temperature exposures. Thus, population of larvae comprised two groups: the first group always underwent freezing within the same temperature range and remained freeze-tolerant, and the second one underwent freezing and died under significantly lower temperatures, *i. e.* changed the survival strategy to freeze-avoidance by supercooling.

It is unknown whether this reorientation of strategies is a common phenomenon for so-called freeze-tolerant organisms, since the classification of freeze-tolerant and freeze-avoiding species is based on laboratory data. Some (or many) animals are likely to use both strategies depending on the habitat conditions (Figure).

Traditionally cold-hardiness is characterized with such indices as SCP, lowest lethal temperature (LLT), time (at constant temperature or the temperature within fixed time period) within which 50% of population dies [6]. At the same time the application of SCP as the only parameter to describe or compare cold-hardiness of insects is not fairly adequate, as the death and damages due to cooling often occur without freezing of body fluids [10]. Ability to supercool may be the result of adaptations not associated with cold, *e. g.* dehydration resistance [56]. In addition, the distribution of SCP is of bimodal character that is probably associated with sex dimorphism. This fact is rarely considered by investigators.

### Freeze-tolerance

Freezing is believed to occur in extracellular space to allow the survival of biological object, since intracellular crystallization is lethal. After crystallization the mortality still depends on temperature and elevates together with rise of organism exposure duration under low temperatures in a frozen state [65, 76].

Freeze-tolerant organisms can be divided into two subgroups: freeze-tolerant during the whole year and developing freeze-tolerance depending on a season [69].

Freeze-tolerant arthropods have three main biochemical components, providing cold-hardiness: ice nucleating agents, polyols and sugars, and AFPs.

как их структура и функции были освещены ранее [4, 22, 25, 42, 77].

Некоторые насекомые обладают нуклеаторами не белковой, а минеральной природы. Например, устойчивые к замерзанию личинки галловой мухи *Eurosta solidaginis* имеют в мальпигиевых сосудах сферулы из фосфата кальция, которые способны инициировать кристаллизацию почти при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$ , что совпадает с температурой замерзания личинок ( $-9,5^{\circ}\text{C}$ ) и значительно отличается от температуры замерзания гемолимфы ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) [50].

У устойчивого к замерзанию литорального двусторчатого моллюска митилиды *Geukensia demissa* НА в гемолимфе не обнаружены, однако в жабрах *G. demissa* выявлена нуклеирующая лед бактерия *Pseudomonas fulva* [46]. Аналогичная роль приписывается льдонуклеирующим бактериям, которые были обнаружены у устойчивых к замерзанию желтой рисовой журчалки *Chilo suppressalis* [67] и жука *H. sparsutum* [73].

В настоящее время известен один вид, способный выдерживать внутриклеточную кристаллизацию – антарктическая нематода *Panagrolaimus davidi*, которая выживает при внутриклеточном кристаллообразовании и превращении в лед почти 82% содержащейся в теле воды [72] и всецело зависит от инокулятивного замерзания, индуцируемого льдом окружающей среды. Это единственный известный науке многоклеточный организм, для которого внутриклеточная кристаллизация не является летальной. Даже родственные виды нематод не способны выживать в подобных условиях [62]. При этом нельзя исключить, что уникальная способность *P. davidi* выживать при образовании кристаллов внутри клеток обусловлена не специфическими механизмами устойчивости к замерзанию, а исключительным потенциалом клеток и тканей данного вида нематод к регенерации после серьезных криоповреждений. На выяснение механизмов устойчивости *P. davidi* возлагались большие надежды, однако пока нет оснований утверждать, что внутриклеточная кристаллизация может стать общебиологическим явлением, которое могло бы найти широкое применение в прикладной криобиологии. Возможно, внутриклеточная кристаллизация более распространена в природе, чем принято считать. Так, внутриклеточная кристаллизация не является летальной для клеток жирового тела *E. solidaginis* [44].

**Криопротекторы.** Устойчивые к замерзанию насекомые также синтезируют криопротекторы (полиолы и сахара), функция которых – ограничивать криоповреждения у видов, замерзающих при  $-5\text{...}-10^{\circ}\text{C}$ , но имеющих двойную функцию у видов

*Ice nucleating agents.* The most of freeze-tolerant insects in winter have ice nucleating agents, limiting supercooling capacity and providing protective extracellular crystallization under high subzero temperatures [28, 29, 75]. Other species do not have active nucleating agents (or have a little number of them) and supercool down to  $-50\text{...}-60^{\circ}\text{C}$ , but remain freeze-tolerant under these temperatures.

Ice nucleating agents in hemolymph were observed in coleopterans, hymenopterans and dipterans [75]. In addition nucleating agents were revealed in the tardigrades *Adorybiotus coronifera* [70] and molluscs *Melampus bidentatus* [33] and *Mytilus edulis* [47].

Ice nucleating agents of invertebrates are proteinaceous [28, 53, 74, 77]. In this research we would not characterize in details these compounds as their structure and functions were presented elsewhere [4, 22, 25, 42, 77].

Some insects have ice nucleating agents of not protein, but mineral nature. For example, Malpighian tubes of freeze-tolerant larvae of the gall fly *Eurosta solidaginis* contain calcium phosphate spherules, which are capable to initiate crystallization near  $-10^{\circ}\text{C}$ , that is close to larva freezing temperature ( $-9,5^{\circ}\text{C}$ ) and differ significantly from hemolymph freezing temperature ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) [50].

No ice nucleating agents were found in hemolymph of the freeze-tolerant littoral bivalve mussel *Geukensia demissa*, however, gills of *G. demissa* contained ice nucleating bacterium *Pseudomonas fulva* [46]. The same action is attributed to ice nucleating bacteria, which were revealed in the freeze-tolerant yellow rice syrphid fly *Chilo suppressalis* [67] and the beetle *H. sparsutum* [73].

Nowadays it is known one species, which is able to survive intracellular crystallization. It is the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*, surviving after intracellular crystal formation and transformation of nearly 82% of body water into ice [72] and completely depending on inoculative freezing induced by environmental ice. This is the only known metazoan organism in which the intracellular crystallization is not lethal. Even related species of nematodes are not capable to survive under such conditions [62]. Herewith one can not exclude that unique capacity of *P. davidi* to survive intracellular crystal formation is stipulated not by specific mechanisms of freeze-tolerance, but by extraordinary potential of cells and tissues of this nematodes to regenerate after severe cryodamages. Elucidation of the tolerance mechanisms of *P. davidi* is promising, however, for the moment there are no reasons to believe intracellular crystallization as common biological phenomenon which could become widely applied in cryobiology. Intracellular crystallization is likely to be more spread in nature than widely thought.

с очень низкими ТПО: изначальное повышение способности к переохлаждению для избегания замерзания (что может быть достаточным) и последующее криозащитное действие, если замерзание всё-таки происходит [13]. Глицерол – самый распространенный криопротектор [76], кроме него у беспозвоночных идентифицированы сорбитол, тритол, эритритол, трегалоза, фруктоза и сахароза [13, 76]. Типичные устойчивые к замерзанию виды насекомых при подготовке к зиме синтезируют нуклеаторы и полиолы. Сезонные исследования жукилицы *Pterostichus brevicornis*, обитающей на Аляске, показали, что содержание глицерола в гемолимфе зимой увеличивалось более, чем в 22 раза [14].

**Антифризные протеины.** Ряд устойчивых к замерзанию видов насекомых содержит АФП [27], причем некоторые из них синтезируют также нуклеаторы для ограничения переохлаждения. Антифризные протеины адсорбируются на поверхности зародышевых кристаллов льда, что не дает им достигать критического размера, достаточного для нуклеации. Кроме того, АФП могут играть важную роль у замерзающих видов осенью до развития устойчивости к замерзанию и весной после ее потери, обеспечивая эффективную антифризную защиту от ранних и поздних заморозков. Кроме того, АФП рыб являются чрезвычайно эффективными ингибиторами рекристаллизации [40]. Подобная функция АФП насекомых обеспечивала бы преимущества устойчивым к замерзанию видам, которые замерзают при повышенных температурах, но вынуждены выживать при  $-30...-60^{\circ}\text{C}$  в природных условиях и подвержены риску повреждения в результате рекристаллизации во время периодов потепления до более высоких субнулевых температур [6]. Белок, ингибирующий рекристаллизацию, также выявлен у нематоды *P. davidi* [71]. Исследованиям АФП посвящен ряд обзоров [2, 3, 12, 22, 24, 25, 32], поэтому мы не будем приводить в данной работе их подробную характеристику.

### Избегание замерзания путем переохлаждения

У чувствительных к замерзанию видов переохлаждение может быть значительным, но если кристаллы льда уже появились, то они растут так быстро, что внутриклеточная вода не успевает диффундировать и превращается во внеклеточный лед с достаточной скоростью для предотвращения летального внутриклеточного замораживания [26].

Способность к переохлаждению зависит от стадии онтогенеза. Яйца зачастую более холодоустойчивы, чем насекомые на других стадиях жизненного цикла. Яйца некоторых чешуекрылых переохлаждаются до  $-50^{\circ}\text{C}$  [5], а яйца некоторых тлей и

For example intracellular crystallization is not lethal for fat body cells of *E. solidaginis* [44].

**Cryoprotectants.** Freeze-tolerant insects also synthesize cryoprotectants (polyols and sugars), which function is to prevent cryodamages in the species freezing under  $-5...-10^{\circ}\text{C}$ , but in species with very low SCP these have a double function: initial increase of supercooling capacity to avoid freezing (that could be sufficient) and the following cryoprotective action in the case if freezing occurs [13]. Glycerol is the most widespread cryoprotectant [76], additionally sorbitol, threitol, erythritol, trehalose, fructose, sucrose are found [13, 76] in invertebrates. Typical freeze-tolerant species of insects synthesize ice nucleating agents and polyols during preparing to winter. Seasonal studies carried-out in the carabid beetle *Pterostichus brevicornis*, inhabiting in Alaska have shown that glycerol content in hemolymph in winter increased more than 22 times [14].

**Antifreeze proteins.** Certain freeze-tolerant insect species contain AFPs [27], moreover some of them also synthesize ice nucleating agents to limit supercooling. Antifreeze proteins adsorb on surface of ice crystal nuclei, preventing them to achieve a critical size sufficient for ice nucleation. Moreover, AFPs could play an important role in freezing species in autumn before development of freeze-tolerance and in spring after its disappearance, providing effective anti-freeze protection against early and late frosts. In addition AFPs of fishes are extremely effective inhibitors of recrystallization [40]. A similar function of insects' AFPs would provide advantages to freeze-tolerant species, which freeze under higher temperatures, but need to survive at  $-30...-60^{\circ}\text{C}$  in natural environment and are exposed to risk of injury due to recrystallization during periods of warming up to higher sub-zero temperatures [6]. A recrystallization inhibiting protein is also revealed in the nematode *P. davidi* [71]. AFP studies were reviewed earlier [2, 3, 12, 22, 24, 25, 32] therefore we would not focus our attention on their characteristics in this article.

### Freeze-avoidance by supercooling

In freeze-sensitive species supercooling may be significant, but if ice crystals have appeared, they grow so fast that intracellular water is not able to diffuse with adequate rate to freeze outside the cell to prevent lethal intracellular freezing [26].

Ability to supercool depends on ontogenesis stage. Eggs are often more cold-resistant than insects of other stages of life cycle. Eggs of some lepidopterans are supercooled down to  $-50^{\circ}\text{C}$  [5], and the ones of some aphides and psyllas are supercooled down to  $-40^{\circ}\text{C}$  [37, 65]. Maybe eggs do not contain ice nucleating

листоблошек – до  $-40^{\circ}\text{C}$  [37, 65]. Вероятно, яйца не содержат нуклеаторов и пригодны для переохлаждения в качестве сосудов. Например, яйца некоторых тропических насекомых, в частности саранчовых, способны переохлаждаться до  $-30^{\circ}\text{C}$ , хотя они никогда не пребывают даже в околонулевых температурах. Сильное переохлаждение, по-видимому, – это природное свойство яиц насекомых, которое приобрело большое значение для видов, зимующих на стадии яйца [6].

*Нуклеаторы льда.* Чувствительные к замерзанию зимующие личинки рогака *Ceruchus piceus* в холодное время года способны понижать ТПО сезонным удалением нуклеаторов-липопротеинов из гемолимфы. Основная функция этих липопротеинов – транспорт липидов – во время диапаузы не существенна [52].

*Криопротекторы.* Глицерол был обнаружен у 64 из 96 исследованных на предмет наличия полиолов и сахаров видов чувствительных к замерзанию арthropод [65]. Остальные полиолы включают сорбитол [49, 63], маннитол [64] и этиленгликоль [31]. Представителями сахаров являются глюкоза, трегалоза и фруктоза [16, 64, 66]. Хроматографический анализ полиолов и сахаров показал, что многие зимующие насекомые обладают многокомпонентными криопротекторными системами. Они включают, например глицерол, сорбитол, фруктозу и трегалозу у устойчивых к замерзанию личинок *E. solidaginis* [49], глицерол, сорбитол, глюкозу и трегалозу – у личинок заболонника березового *Scolytus ratzeburgi* [58], глицерол, маннитол и трегалозу – у антарктической ногохвостки *Cryptopygus antarcticus* [65]. Многокомпонентные системы считаются более предпочтительными, поскольку они снижают возможные токсические эффекты, связанные с высокими концентрациями одного компонента, которые потребовались бы для достижения такого же уровня криозащиты [13, 49, 58, 59]. У избегающих замерзания насекомых полиолы и сахара могут играть важную роль, отличную от роли АФП [27, 59]. Глицерол может стабилизировать ферменты при низких температурах, защищая их от денатурации [34], и действовать в качестве антивысушивающего агента (как у ангидробиотических организмов [21]).

*Антифризные протеины.* У некоторых видов АФП способны инактивировать НА, что также может проявляться как сезонное повышение способности к переохлаждению [26]. При добавлении очищенного АФП большого мучного хрущака *T. molitor* к гемолимфе таракана *Periplaneta americana*

agents and are suitable for supercooling as containers. For example, eggs of some tropical insects, particularly *Acrididae*, are able to supercool down to  $-30^{\circ}\text{C}$  even though they never meet near-zero temperatures. Evidently, significant supercooling is a natural property of insect eggs which gained a great importance for the species, overwintering at egg stage [6].

*Ice nucleating agents.* Freeze-sensitive overwintering larvae of the stag beetle *Ceruchus piceus* are able to reduce SCP by seasonal removing of lypoprotein ice nucleators out of hemolymph. A main function of these lypoproteins, *i. e.* transport of lipids, is not significant during diapause [52].

*Cryoprotectants.* Glycerol was revealed in 64 from 96 of freeze-tolerant arthropod species screened for the presence of polyols and sugars [65]. Other polyols were sorbitol [49, 63], mannitol [64] and ethylene glycol [31]. The sugars were glucose, trehalose and fructose [16, 64, 66]. Chromatographic analysis of polyols and sugars showed that the most overwintering insects had multicomponent cryoprotective systems. These comprise, for example, glycerol, sorbitol, fructose and trehalose in freeze-tolerant larva *E. solidaginis* [49]; glycerol, sorbitol, glucose and trehalose were found in the birch bark beetle larvae *Scolytus ratzeburgi* [58]; glycerol, mannitol and trehalose in the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* [65]. Multicomponent systems are considered to be more preferable, as they reduce potential toxic effects, associated with high concentration of one component, required to achieve the same level of cryoprotection [13, 49, 58, 59]. In freeze-avoiding insects polyols and sugars can play an important role that differs from the one of AFPs [27, 59]. Glycerol can stabilize enzymes under low temperatures, protecting them from denaturation [34] and act as anti-desiccation agent (as in anhydrobiotic organisms [21]).

*Antifreeze proteins.* In some species AFPs are able to inactivate ice nucleating agents that could be also manifested as a seasonal increase of supercooling ability [26]. Addition of purified AFP of the yellow mealworm *T. molitor* into hemolymph of the cockroach *Periplaneta americana* reduce SCP of hemolymph by  $2^{\circ}\text{C}$  (from  $-14$  down to  $-16^{\circ}\text{C}$ ), but this effect disappeared after thermal exposition of the sample [27].

Antifreeze proteins have advantages if compared with low-molecular antifreezes such as polyols and sugars [27]. AFPs act non-colligatively and do not cause significant increase of osmotic pressure, unlike high concentration of polyols does. Moreover, such cryoprotectants as glycerol and trehalose take part in impor-

понижалась ТПО гемолимфы на 2°C (от –14 до –16°C), но этот эффект исчезал, если образец подвергался тепловой обработке [27].

Антифризные протеины имеют преимущества по сравнению с низкомолекулярными антифризами – полиолами и сахарами [27]. АФП действуют неколлагативным образом и не приводят к значительному повышению осмотического давления, связанному с высокой концентрацией полиолов. Кроме того, такие криопротекторы, как глицерол и трегалоза, являются участниками важных метаболических процессов, а это требует комплексной перестройки их регуляторных механизмов для обеспечения синтеза при подготовке к зиме и последующего катаболизма этих соединений после зимовки [6].

**Белки-шапероны.** В последнее время множество работ было посвящено исследованию роли стрессовых белков в репарации повреждений, возникших в результате действия экстремальных факторов. Диапазирующие “зимние” и холодоакклимированные “летние” куколки луковой мухи *Delia antiqua* характеризуются высокой холодоустойчивостью [38]. Обнаружена положительная корреляция между уровнем мРНК одного из шаперонов, выживаемостью при низкой температуре и степенью полимеризации актина, который является субстратом для данного шаперона. Актин мальпигиевых сосудов не акклимированных к холоду куколок находится в деполимеризованном состоянии, в то время как актин холодоакклимированных *D. antiqua* остается в полимеризованном виде. За деполимеризацией актина следуют явные нарушения структуры клеточных мембран. Таким образом, данный шаперон принимает непосредственное участие в развитии холодоустойчивости этих насекомых, предотвращая индуцируемую холодом деполимеризацию актина. Шаперон из семейства белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) является частью сложного комплекса биохимических адаптаций к холоду у красноклопа обыкновенного *Pyrrhocoris apterus* [41]. У серых мясных мух подавление экспрессии БТШ23 и БТШ70 не влияло на вхождение насекомых в диапаузу и на ее длительность, однако резко снижало выживаемость диапазирующих куколок при низких температурах. Роль шаперонов в механизмах холодоустойчивости обсуждалась в [18, 45, 48, 55]. Rinehart J.P. *et al.* считают, что индукция синтеза шаперонов – основной фактор развития холодоустойчивости насекомых [57].

**Холодовой шок.** Хотя ТПО представляет собой теоретически низший предел температурной устойчивости, было обнаружено, что охлаждение

tant metabolic processes, that require a complex changes in regulation of these processes to provide synthesis of these substances during cold-hardening and the following catabolism of these compounds after overwintering [6].

**Chaperone proteins.** Recently many authors paid their attention to the role of stress proteins in reparation of damages, resulting from the effect of extreme factors. Diapausing “winter” and cold-acclimated “summer” pupae of the onion fly *Delia antiqua* are characterized by a high cold-hardiness [38]. Positive correlation was observed among mRNA rate of the one of chaperones, low-temperature survival and actin polymerization rate, being a substrate of this chaperone. Actin of Malpighian tubes in non-acclimated pupae was depolymerized, while actin of cold-acclimated *D. antiqua* remained polymerized. Significant impairment of cell membrane structure follow actin depolymerization. Thus, this chaperone directly takes part in cold-hardiness development in these insects, preventing cold-induced depolymerization of actin. In the fire bug *Pyrrhocoris apterus* [41] the heat shock protein chaperone with molecular mass of 70 kDa (HSP70) is a part of complex biochemical cold-adaptations. In the flesh flies the suppression of HSP23 and HSP70 did not affect insects’ diapause and its duration, however, sharply reduced the survival of diapausing pupae under low temperatures. The role of chaperones in cold-hardiness mechanisms was already discussed [18, 45, 48, 55]. Rinehart J.P. *et al.* believed that induction of chaperone synthesis is the main factor of cold-hardiness development in insects [57].

**Cold shock.** Although SCP is the lowest limit of temperature resistance it was revealed that even cooling without tissue freezing might result in lethal damages [39, 43]. In one species (for example, larvae of *Mamesta configurata*) these damages appear only after long periods of low-temperature exposure [68], and in other ones even a short-term exposure at the temperatures above SCP is lethal. For example, SCP of freeze-tolerant pupae *S. crassipalpis* makes –23°C, however, they do not survive after 20 min exposure at –17°C [43].

Cold shock is a stress, caused by short-term exposure under low, but not freezing temperatures [23]. It is suggested that mechanism of damages due to cold shock lies in induction of phase transfers of membrane lipids, resulting in the following loss of membrane integrity [54]. The role of membranes in this phenomenon has still been a matter of arguments. Shreve S.M. *et al.* showed that addition of cholesterol into the food the *Drosophila melanogaster* sharply increased the ability of flies to rapid cold hardening: more than 70%

без замораживания тканей может приводить к летальным повреждениям [39, 43]. У одних видов (например, гусеницы *Mamesta configurata*) такие повреждения появляются только после длительных периодов низкотемпературной экспозиции [68], у других – кратковременные экспозиции при температурах выше ТПО летальны. Например, ТПО куколок, чувствительных к замерзанию *S. crassipalpis*, составляет  $-23^{\circ}\text{C}$ , однако они не выживают после 20-минутной экспозиции при  $-17^{\circ}\text{C}$  [43].

Холодовым шоком называют стресс, вызванный кратковременной экспозицией при низких, но не замораживающих температурах [23]. Предполагают, что механизм повреждений вследствие холодового шока состоит в индукции фазовых переходов липидов мембран, ведущих к последующей потере целостности мембран [54]. Роль мембран в этом явлении до сих пор является предметом дискуссий. Shreve S.M. *et al.* показали, что добавление холестерина в пищу *Drosophila melanogaster* резко увеличивало способность мух к быстрой холодовой закалке: более 70% мух выживало после 2-часовой экспозиции при  $-5^{\circ}\text{C}$  [61]. Установлено, что холестерол увеличивает прочность клеточных мембран [1]. Известно также, что одним из компонентов холодоустойчивости многих организмов является сезонное увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот (НЖК) в мембранах, что снижает температуру фазовых переходов мембранных липидов [1]. Тем не менее у свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*, имеющей повышенное содержание НЖК, не наблюдали корреляции между степенью ненасыщенности липидов и уровнем холодоустойчивости [51].

Холодовой шок может также вызывать серьезные изменения в ядрах клеток. Garsia S.L. *et al.* [30] показали, что после холодового шока ядра клеток мальпигиевых сосудов клопа *Panstrongylus megistus* сливались, образуя “гиганты”. Гетерохроматин в ядрах был развернут. Обычные ядра и “гиганты” имели признаки типичного и потенциального апоптоза сразу после шока, а впоследствии и некроза.

Bale J.S. [8, 9] предложил, помимо двух традиционных стратегий холодоустойчивости – устойчивости к замерзанию и избегание замерзания, – выделять еще 3 группы видов в зависимости от их реакции на понижение температуры.

Группа “chill tolerant” объединяет виды с низкими ТПО ( $-20\dots-30^{\circ}\text{C}$ ) и относительно высокой холодоустойчивостью, но отличается от типичных избегающих замерзания видов тем, что они частично гибнут при температурах выше ТПО. К таким видам относятся полярный клещ *Alaskozetes antarcticus*, имеющий ТПО  $-30^{\circ}\text{C}$  и 73%-ю выживаемость после 100 суток пребывания при  $-20^{\circ}\text{C}$  [17], долгоносик *Rhychaenus fagi* из средних ши-

of flies survived after 2 hours of exposure at  $-5^{\circ}\text{C}$  [61]. It was established that cholesterol increased stability of cell membranes [1]. It is also known that one of the components of cold-hardiness of many organisms is a seasonal increase of content of unsaturated fatty acids (UFAs) in membranes, decreasing temperature of phase transfers of membrane lipids [1]. Nevertheless, in the free living nematode *Caenorhabditis elegans* with an increased content of UFAs the correlation between lipid unsaturation rate and cold-hardiness level was not observed [51].

Cold shock could also cause severe changes in cell nuclei. Garsia S.L. *et al.* [30] showed that cold shock resulted in fusion and formation of “giant” nuclei of Malpighian tube cells in the bug *Panstrongylus megistus*. Heterochromatin in nuclei was decompacted. Both “normal” and “giant” nuclei revealed signs of typical and potential apoptosis just after cold shock, followed later by necrosis.

Bale J.S. [8, 9] suggested in addition to two traditional strategies of cold-hardiness, *i.e.* freeze-tolerance and freeze-avoidance, to specify more 3 groups of species depending on their reaction on temperature reduction.

“Chill tolerant” group combines the species with low SCPs ( $-20\dots-30^{\circ}\text{C}$ ) and relatively high cold-hardiness, but differing from typical freeze-avoiding species by their partial death at the temperatures above SCP. These include the polar mite *Alaskozetes antarcticus*, possessing SCP of  $-30^{\circ}\text{C}$  and 73% survival after 100-day-long keeping at  $-20^{\circ}\text{C}$  [17], and the beech weevil *Rhychaenus fagi* from mid-latitudes with SCP of  $-25^{\circ}\text{C}$  and only 26% survival after 56-day-long keeping at  $-15^{\circ}\text{C}$  [7].

“Chill susceptible” are the species, which also can be supercooled down to extremely low temperatures, but die even after short exposures (minutes or hours) at the temperatures which are significantly higher than SCP. In overwintering anholocyclic clones of the aphides *Myzus persicae* LLT is by  $15\text{--}18^{\circ}\text{C}$  higher than SCP ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) after just a minute exposure [19, 36].

“Opportunistic survival” group combines species not capable to exist under threshold temperature of their development. *M. domestica* pupae undergo freezing under  $15^{\circ}\text{C}$ , but 100% mortality is observed after 5 days at  $0^{\circ}\text{C}$  [20]. These species overwinter under thermally protected conditions, *e. g.* in animal burrows.

We could conclude, that recently the most of researches of invertebrate cold-hardiness have been directed to specify the classification of cold-hardiness species and determination of cold-hardiness molecular mechanisms, herewith the studying of specific mechanisms of hardiness to intracellular crystallization is of a special interest. In addition the task about cold-hardiness occurrence in different taxons of invertebrates during evolution has remained open.



рот с ТПО  $-25^{\circ}\text{C}$  и всего лишь 26%-й выживаемостью после 56 суток пребывания при  $-15^{\circ}\text{C}$  [7].

Группа “chill susceptible” – это виды, которые также могут переохлаждаться до очень низких температур, однако гибнут даже после кратких экспозиций (минуты или часы) при температурах, значительно превышающих ТПО. У зимующих англоциклических клонов афид *Myzus persicae* НЛТ на  $15-18^{\circ}\text{C}$  выше ТПО ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) после всего лишь минутной экспозиции [19, 36].

Группа “opportunistic survival” (“оппортунистическое или конъюнктурное выживание”) объединяет виды, не способные существовать ниже пороговой температуры их развития. Куколки *M. domestica* замерзают при  $-15^{\circ}\text{C}$ , однако 100%-я смертность наблюдается уже после 5 суток при  $0^{\circ}\text{C}$  [20]. Такие виды зимуют в термически защищенных условиях, например в норах животных.

Можно заключить, что в последние годы большинство исследований по холодоустойчивости беспозвоночных направлены на уточнение классификации холодоустойчивых видов и выяснение молекулярных механизмов холодоустойчивости, при этом исследование специфических механизмов устойчивости к внутриклеточной кристаллизации представляет особый интерес. Кроме того, остается открытым вопрос о возникновении холодоустойчивости в различных таксонах беспозвоночных в процессе эволюции.

## Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– С. 151–168.
2. Гулевский А.К., Релина Л.И. Антифризные белки. Сообщение I. Классификация и механизм действия // Проблемы кробиологии.– 2009.– Т. 19, №1.– С. 18–24.
3. Гулевский А.К., Релина Л.И. Антифризные белки. Сообщение II. Распространение в природе // Проблемы кробиологии.– 2009.– Т. 19, №2.– С. 121–136.
4. Гулевский А.К., Релина Л.И. Нуклеирующие агенты позвоночных и беспозвоночных животных // Проблемы кробиологии. – 2010.– Т. 20, №4.– С. 354–364.
5. Bakke A. Extremely low supercooling point in eggs of *Zeiraphera diniana* (Guene) (*Lepidoptera: Tortricidae*) // *Norw. J. Ent.*– 1969.– Vol. 16, N1.– P. 81–83.
6. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // *Agr. Zool. Rev.*– 1989.– N3.– P. 157–192.
7. Bale J.S. Insects at low temperature: a predictable relationship? // *Funct. Ecol.*– 1991.– Vol. 5, N2.– P. 291–298.
8. Bale J.S. Insect cold hardiness: a matter of life and death // *Eur. J. Entomol.*– 1996.– Vol. 93, N3.– P.369–382.
9. Bale J.S. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 849–862.
10. Bale J.S., Hayward S.A. Insect overwintering in a changing climate // *J. Exp. Biol.* – 2010. – Vol. 213, N6. – P. 980–994.
11. Bale J.S., Worland M.R., Block W. Effects of summer frost exposures on the cold tolerance strategy of a sub-Antarctic beetle // *J. Insect. Physiol.*–2001.–Vol. 47, Issue 10.–P. 1161–1167.
12. Barret J. Thermal hysteresis proteins // *Int. J. Biochem Cell. Biol.*– 2001.– Vol. 33, N2.– P. 105–117.

## References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. *Cryobiology*.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– P. 151–168.
2. Gulevsky A.K., Relina L.I. Antifreeze proteins. Report I. Classification and mechanism of action // *Problems of Cryobiology*.– 2009.– Vol. 19, N1.– P. 18–24.
3. Gulevsky A.K., Relina L.I. Antifreeze proteins. Report II. Occurrence in nature // *Problems of Cryobiology*.– 2009.– Vol. 19, N1.– P. 121–136.
4. Gulevsky A.K., Relina L.I. Nucleating agents of vertebrates and invertebrates // *Problems of Cryobiology*.– 2010.– Vol. 20, N4.– P. 354–364.
5. Bakke A. Extremely low supercooling point in eggs of *Zeiraphera diniana* (Guene) (*Lepidoptera: Tortricidae*) // *Norw. J. Ent.*– 1969.– Vol. 16, N1.– P. 81–83.
6. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // *Agr. Zool. Rev.*– 1989.– N3.– P. 157–192.
7. Bale J.S. Insects at low temperature: a predictable relationship? // *Funct. Ecol.*– 1991.– Vol. 5, N2.– P. 291–298.
8. Bale J.S. Insect cold hardiness: a matter of life and death // *Eur. J. Entomol.*– 1996.– Vol. 93, N3.– P.369–382.
9. Bale J.S. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 849–862.
10. Bale J.S., Hayward S.A. Insect overwintering in a changing climate // *J. Exp. Biol.* – 2010. – Vol. 213, N6. – P. 980–994.
11. Bale J.S., Worland M.R., Block W. Effects of summer frost exposures on the cold tolerance strategy of a sub-Antarctic beetle // *J. Insect. Physiol.*–2001.–Vol. 47, Issue 10.–P. 1161–1167.
12. Barret J. Thermal hysteresis proteins // *Int. J. Biochem Cell. Biol.*– 2001.– Vol. 33, N2.– P. 105–117.
13. Baust J.G. Mechanisms of cryoprotection in freezing-tolerant animal systems // *Cryobiology*.– 1973.–Vol. 10, N1.– P. 197–205.
14. Baust J. G., Miller L. K. Variations in glycerol content and its influence on cold hardiness in the alaskan carabid beetle *Pterostichus brevicornis* // *J. Insect. Physiol.*– 1970.– Vol. 16, N9.– P. 979–990.
15. Block W. Cold hardiness in invertebrate poikilotherms // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1982.– Vol. 73A, N6.– P. 581–593.
16. Block W., Zettel J. Cold hardiness of some alpine *Collembola* // *Ecol. Entomol.* – 1980. – Vol. 5, N1. – P. 1–9.
17. Cannon R.J.C., Block W. Cold tolerance of microarthropods // *Biol. Rev.*– 1988.– Vol. 63, Issue 1.– P. 23–77.
18. Chown S.L., Nicolson S.W. *Insect physiological ecology: mechanisms and patterns*.– Oxford University Press, 2004.– 254 p.
19. Clough M.S., Bale J.S., Harrington R. Differential cold hardiness in adults and nymphs of the peach-potato aphid *Myzus persicae* // *Ann. Appl. Biol.*– 1990.– Vol. 116, N1.– P. 1–9.
20. Coulson S.J., Bale J.S. Anoxia induces rapid cold hardening in the housefly *Musca domestica* // *J. Insect. Physiol.*– 1991.– Vol. 37, Issue 7.– P. 497–501.
21. Crowe J., Clegg J. S. *Anhydrobiosis*.– Stroudsburg: Dowden, Hutchinson and Ross, 1973.– 326 p.
22. Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J., Walker V.K. Structure and function of antifreeze proteins // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 927–935.
23. Denlinger D.L., Joplin K.H., Chen C.P. et al. Cold shock and heat shock // *Insects at Low Temperature* / Eds: Lee R.E. Jr., Denlinger D.L.– New York, London: Chapman&Hall, 1991.– P. 131–148.
24. Doucet D., Walker V.K., Qin W. The bugs that came from cold: molecular adaptations to low temperature in insects // *Cell. Mol. Life Sci.*– 2009.– Vol. 66, N8.– P. 1404–1418.
25. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 327–357.
26. Duman J.G., Horwarth K. The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects // *Ann. Rev. Physiol.*– 1983.– Vol. 45, N3.– P. 261–270.
27. Duman J.G., Horwarth K., Tomchaney A. et al. Antifreeze agents in terrestrial arthropods // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1982.– Vol. 73A, N6.– P. 545–555.

13. Baust J.G. Mechanisms of cryoprotection in freezing-tolerant animal systems // *Cryobiology*.— 1973.— Vol. 10, N1.— P. 197–205.
14. Baust J. G., Miller L. K. Variations in glycerol content and its influence on cold hardiness in the alaskan carabid beetle *Pterostichus brevicornis* // *J. Insect. Physiol.*— 1970.— Vol. 16, N9.— P. 979–990.
15. Block W. Cold hardiness in invertebrate poikilotherms // *Comp. Biochem. Physiol.*— 1982.— Vol. 73A, N6.— P. 581–593.
16. Block W., Zettel J. Cold hardiness of some alpine *Collemdola* // *Ecol. Entomol.* — 1980. — Vol. 5, N1. — P. 1–9.
17. Cannon R.J.C., Block W. Cold tolerance of microarthropods // *Biol. Rev.*— 1988.— Vol. 63, Issue 1.— P. 23–77.
18. Chown S.L., Nicolson S.W. Insect physiological ecology: mechanisms and patterns.— Oxford University Press, 2004.— 254 p.
19. Clough M.S., Bale J.S., Harrington R. Differential cold hardiness in adults and nymphs of the peach-potato aphid *Myzus persicae* // *Ann. Appl. Biol.*— 1990.— Vol. 116, N1.— P. 1–9.
20. Coulson S.J., Bale J.S. Anoxia induces rapid cold hardening in the housefly *Musca domestica* // *J. Insect. Physiol.*— 1991.— Vol. 37, Issue 7.— P. 497–501.
21. Crowe J., Clegg J. S. Anhydrobiosis.— Stroudsberg: Dowden, Hutchinson and Ross, 1973.— 326 p.
22. Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J., Walker V.K. Structure and function of antifreeze proteins // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*— 2002.— Vol. 357, N1423.— P. 927–935.
23. Denlinger D.L., Joplin K.H., Chen C.P. et al. Cold shock and heat shock // *Insects at Low Temperature / Eds: Lee R.E. Jr., Denlinger D.L.*— New York, London: Chapman&Hall, 1991.— P. 131–148.
24. Doucet D., Walker V.K., Qin W. The bugs that came from cold: molecular adaptations to low temperature in insects // *Cell. Mol. Life Sci.*— 2009.— Vol. 66, N8.— P. 1404–1418.
25. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // *Annu. Rev. Physiol.* — 2001. — Vol. 63. — P. 327–357.
26. Duman J.G., Horwarth K. The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects // *Ann. Rev. Physiol.*— 1983.— Vol. 45, N3.— P. 261–270.
27. Duman J.G., Horwarth K., Tomchanev A. et al. Antifreeze agents in terrestrial arthropods // *Comp. Biochem. Physiol.*— 1982.— Vol. 73A, N6.— P. 545–555.
28. Duman J.G., Morris J.P., Castellino F.J. Purification and composition of an ice nucleating protein from queens of the hornet *Vespa maculata* // *J. Comp. Physiol.*— 1984.— Vol. B154, N1.— P. 79–83.
29. Duman J.G., Neven L. G., Beals J. H. et al. Freeze-tolerance adaptations including hemolymph protein and lipoprotein nucleators in the larvae of the crane fly, *Tipula trivittata* // *J. Ins. Physiol.*— 1985.— Vol. 31, N1.— P. 1–8.
30. Garsia S.L., Mello M.L.S., Garsia N.L., Rodrigues V.L.C.C. Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistrus* (Burmeister) // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*— 2000.— Vol. 95, N6.— P. 893–898.
31. Gehrken U. Winter survival of an adult bark beetle *Ips accuminatus* Gyll // *J. Ins. Physiol.*— 1984.— Vol. 30, N4.— P. 421–429.
32. Graether S.P., Sykes B.D. Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins // *Eur. J. Biochem.*— 2004.— Vol. 271, N16.— P. 3285–3296.
33. Hayes D.R., Loomis S.H. Evidence for a proteinaceous ice nucleator in the haemolymph of the pulmonate gastropod *Melampus bidentatus* // *Cryo-Letters.*— 1985.— Vol. 6, N6.— P. 418–421.
34. Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation.— Philadelphia: B. Saunders, 1973.— 248 p.
35. Horwath K.L., Duman J.G. Induction of antifreeze protein production by juvenile hormone in larvae of the beetle *Dendroides canadensis* // *J. Comp. Physiol.*— 1983.— Vol. 151, N2.— P. 233–240.
36. Howling G.G., Bale J.S., Harrington R. Effects of extended and repeated exposures to low temperature on mortality of the peach-potato aphid *Myzus persicae* // *Ecol. Entomol.*— 1994.— Vol. 19, Issue 4.— P. 361–366.
37. James B.D., Luff M.L. Cold-hardiness and development of eggs of *Rhopalosiphum insertum* // *Ecol. Entomol.*— 1982.— Vol. 7, N4.— P. 277–282.
38. 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.— Vol. 4, N14.— P. e8277.
39. Knight J.D., Bale J. S., Franks F. et al. G. Insect cold hardiness: supercooling points and prefreeze mortality // *CryoLetters.*— 1986.— Vol. 8, N4.— P. 194–203.
40. Knight J.D., De Vries A. L., Oolman L. D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice // *Nature.*— 1984.— Vol. 308, N31.— P. 295–296.
41. Kostal V., Tollarova-Borovanska M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus* // *PLoS One.*— 2009.— Vol. 4, N2.— P. e4546.
42. Lee R.E. Jr., Costanzo J.P. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals // *Annu. Rev. Physiol.*— 1998.— Vol. 60.— P. 55–72.
43. Lee R.E., Denlinger D. L. Cold-tolerance in diapausing and non-diapausing stages of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* // *Physiol. Entomol.*— 1985.— Vol. 10, N3.— P. 309–315.
44. Lee R.E., McGrath J.J., Morason R.T. et al. Survival of intracellular freezing, lipid coalescence and osmotic fragility in fat body cells of the freeze-tolerant gallfly *Eurosta solidaginis* // *J. Insect. Physiol.*— 1993.— Vol. 39, Issue 5.— P. 445–450.
45. Li A. Identification of proteins associated with insect diapause and stress tolerance: Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University.— 2008.— 196 p.
46. Loomis S.H., Zinser M. Isolation and identification of an ice-nucleating bacterium from the gills of the intertidal bivalve mollusc *Geukensia demissa* // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*— 2001.— Vol. 261, N2.— P. 225–235.
47. Lundheim R. Ice nucleation in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Marine Biology.*— 1997.— Vol. 128, N2.— P. 267–271.
48. Michaud M.R. Molecular physiology of insect low temperature stress responses: Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University.— 2007.— P. 16–19.

37. James B.D., Luff M.L. Cold-hardiness and development of eggs of *Rhopalosiphum insertum* // *Ecol. Entomol.*– 1982.– Vol. 7, N4.– P. 277–282.
38. 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.– Vol. 4, N14.– P. e8277.
39. Knight J.D., Bale J. S., Franks F. et al. G. Insect cold hardiness: supercooling points and prefreeze mortality // *CryoLetters.*– 1986.– Vol. 8, N4.– P. 194–203.
40. Knight J.D., De Vries A. L., Oolman L. D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice // *Nature.*– 1984.– Vol. 308, N31.– P. 295–296.
41. Kostal V., Tollarova–Borovanska M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus* // *PLoS One.*– 2009.– Vol. 4, N2.– P. e4546.
42. Lee R.E.Jr., Costanzo J.P. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals // *Annu. Rev. Physiol.*– 1998.– Vol. 60.– P. 55–72.
43. Lee R.E., Denlinger D. L. Cold-tolerance in diapausing and non-diapausing stages of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* // *Physiol. Entomol.*– 1985.– Vol. 10, N3.– P. 309–315.
44. Lee R.E., McGrath J.J., Morason R.T. et al. Survival of intracellular freezing, lipid coalescence and osmotic fragility in fat body cells of the freeze-tolerant gallfly *Eurosta solidaginis* // *J. Insect. Physiol.*– 1993.– Vol. 39, Issue 5.– P. 445–450.
45. Li A. Identification of proteins associated with insect diapause and stress tolerance: Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University.– 2008.– 196 p.
46. Loomis S.H., Zinser M. Isolation and identification of an ice-nucleating bacterium from the gills of the intertidal bivalve mollusc *Geukensia demissa* // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*– 2001.– Vol. 261, N2.– P. 225–235.
47. Lundheim R. Ice nucleation in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Marine Biology.*– 1997.– Vol. 128, N2.– P. 267–271.
48. Michaud M.R. Molecular physiology of insect low temperature stress responses: Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University.– 2007.– P. 16–19.
49. Morrissey R. E., Baust J. G. The ontogeny of cold tolerance in the gall fly *Eurosta solidaginis* // *J. Ins. Physiol.*– 1976.– Vol. 22, N4.– P. 431–437.
50. Mugnano J.A., Lee R.E., Taylor R.T. Fat body cells and calcium phosphate spherules induce ice nucleation in the freeze tolerant larvae of the gall fly *Eurosta solidaginis* (Diptera, Tephritidae) // *J. Exp. Biol.*– 1996.– Vol. 199, Issue 2.– P. 465–471.
51. Murray P., Hayward S.A., Govan G.G. et al. An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 2007.– Vol. 104, N13.– P. 5489–5494.
52. Neven L. G., Duman J. G., Beals J. M. et al. Overwintering adaptations of the stang beetle, *Ceruchus piceus*: removal of ice nucleators in winter to promote supercooling // *J. Comp. Physiol.*– 1986.– Vol. B156, N7.– P. 707–716.
53. Neven L., Duman J.G., Low M.G. et al. Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: Evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity // *J. Comp. Physiol.*– 1989.– Vol. 159, N1.– P. 71–82.
54. Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membranes // *Cryobiology.*– 1985.– Vol. 22, N2.– P. 128–146.
55. Relina L.I., Gulevsky A.K. A possible role of molecular chaperones in cold adaptation // *CryoLetters.*– 2003.– Vol. 24, N4.– P. 203–212.
56. Renault D., Salin C., Vannier G. et al. Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? // *CryoLetters.*– 2002.– Vol. 23, N4.– P. 217–228.
57. Rinehart J.P., Li A., Yocum G.D. et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 2007.– Vol. 104, N27.– P. 11130–11137.
58. Ring R. A. Cold-hardiness of the bark beetle *Scolytus ratzeburgi* Jans. (Coleoptera: Scolytidae) // *Norw. J. Ent.*– 1977.– Vol. 24, N2.– P. 125–136.
59. Ring R. A. Insects and their cells // *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology* / Eds.: M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant.– London.: Pitman Medical, 1980.– P. 187–217.
60. Salt R.W. Principles of insect cold-hardiness // *Ann. Rev. Entomol.*– 1961.– Vol. 1, N1.– P. 55–74.
61. Shreve S.M., Yi S.X., Lee R.E.Jr. Increased dietary cholesterol enhances cold tolerance in *Drosophila melanogaster* // *CryoLetters.*– 2007.– Vol. 28, N1.– P. 33–37.
62. Smith T., Wharton D.A., Marshall C.J. Cold tolerance of an Antarctic nematode that survives intracellular freezing: comparisons with other nematode species // *J. Comp. Physiol. B.*– 2008.– Vol. 178, N1.– P. 93–100.
63. Somme L. Changes in sorbitol content and supercooling points in overwintering eggs of the European red mite *Panonychus ulmi* (Koch) // *Can. J. Zool.*– 1965.– Vol. 43, N12.– P. 881–884.
64. Somme L. Mannitol and glycerol in overwintering aphid eggs // *Norwegian Journal of Entomology.*– 1969.– Vol. 16, N2.– P. 107–111.
65. Somme L. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1982.– Vol. 73A, N5.– P. 519–543.
66. Tanno K. High sugar level in the salivary bee ceratina // *Low Temperature Science.*– 1964.– Vol. B22, N1.– P. 51–57.
67. Tsumuki H., Konno H., Maeda T. et al. An ice-nucleating active fungus isolated from the gut of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) // *J. Insect. Physiol.*– 1992.– Vol. 38, Issue 2.– P. 119–125.
68. Turnock W.J., Lamb R.J., Bodnaryk R.P. Effect of cold stress during pupal diapause on the survival and development of *Mamesta configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) // *Oecologia.*– 1983.– Vol. 63, N4.– P. 185–192.
69. Vernon P., Vannier G. Evolution of freezing susceptibility and freezing tolerance in terrestrial arthropods // *C. R. Biol.*– 2002.– Vol. 325, N12.– P. 1185–1190.

57. Rinehart J.P., Li A., Yocum G.D. et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2007.– Vol. 104, N27.– P. 11130–11137.
58. Ring R. A. Cold-hardiness of the bark beetle *Scolytus ratzeburgi* Jans. (Coleoptera: Scolytidae) // Norw. J. Ent.– 1977.– Vol. 24, N2.– P. 125–136.
59. Ring R. A. Insects and their cells // Low Temperature Preservation in Medicine and Biology / Eds.: M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant.– London.: Pitman Medical, 1980.– P. 187–217.
60. Salt R.W. Principles of insect cold-hardiness // Ann. Rev. Entomol.– 1961.– Vol. 1, N1.– P. 55–74.
61. Shreve S.M., Yi S.X., Lee R.E.Jr. Increased dietary cholesterol enhances cold tolerance in *Drosophila melanogaster* // CryoLetters.– 2007.– Vol. 28, N1.– P. 33–37.
62. Smith T., Wharton D.A., Marshall C.J. Cold tolerance of an Antarctic nematode that survives intracellular freezing: comparisons with other nematode species // J. Comp. Physiol. B.– 2008.– Vol. 178, N1.– P. 93–100.
63. Somme L. Changes in sorbitol content and supercooling points in overwintering eggs of the European red mite *Panonychus ulmi* (Koch) // Can. J. Zool.– 1965.– Vol. 43, N12.– P. 881–884.
64. Somme L. Mannitol and glycerol in overwintering aphid eggs // Norwegian Journal of Entomology.– 1969.– Vol. 16, N2.– P. 107–111.
65. Somme L. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N5.– P. 519–543.
66. Tanno K. High sugar level in the salivary bee ceratina // Low Temperature Science.– 1964.– Vol. B22, N1.– P. 51–57.
67. Tsumuki H., Konno H., Maeda T. et al. An ice-nucleating active fungus isolated from the gut of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) // J. Insect. Physiol.– 1992.– Vol. 38, Issue 2.– P. 119–125.
68. Turnock W.J., Lamb R.J., Bodnaryk R.P. Effect of cold stress during pupal diapause on the survival and development of *Mamesta configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) // Oecologia.– 1983.– Vol. 63, N4.– P. 185–192.
69. Vernon P., Vannier G. Evolution of freezing susceptibility and freezing tolerance in terrestrial arthropods // C. R. Biol.– 2002.– Vol. 325, N12.– P. 1185–1190.
70. Westh P., Kristiansen J., Hvidt A. Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade *Adorybiotus coronifer* // Comp. Biochem. Physiol. PartA.– 1991.– Vol. 99, Issue 3.– P.401–404.
71. Wharton D.A. The environmental physiology of Antarctic terrestrial nematodes: a review // J. Comp. Physiol. B.– 2003.– Vol. 173, N8.– P. 621–628.
72. Wharton D.A., Block W. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) which survives intracellular freezing // Cryobiology.– 1997.– Vol. 34, N2.– P. 114–121.
73. Worland M.R., Block W. Ice-nucleating bacteria from the gut of two sub-Antarctic beetles *Hydromedion sparsutum* and *Perimylops antarcticus* // Cryobiology.– 1999.– Vol. 38, Issue 1.– P. 60–67.
74. Yeung K.L., Wolf E.E., Duman J.G. A scanning tunneling microscopy study of an insect lipoprotein ice nucleator // J. Vac. Sci. Technol. B. – 1991. – Vol. 9, Issue 2. – P. 1197–1201.
75. Zachariassen K. E. Nucleating agents in cold-hardy insects // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N5.– P. 557–562.
76. Zachariassen K.E. Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev.– 1985.– Vol. 65.– P. 799–832.
77. Zachariassen K.E., Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature // Cryobiology.– 2000.– Vol. 41, N4.– P. 257–279.

Accepted 23.11.2011

Поступила 23.11.2011  
Рецензент В.В. Рязанцев