

Льдонуклеирующая активность гемолимфы *Upis ceramboides*, обитающего в Центральной Якутии

UDC 595.7(571.56)

N.G. Li

Ice-Nucleating Activity of Hemolymph of *Upis ceramboides* Beetle Inhabiting in Central Yakutia

Стратегия холодоустойчивости *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae) основана на толерантности к замерзанию, которая позволяет данному виду обитать в экстремально холодном климате Якутии. Морозотолерантность обусловлена присутствием льдонуклеирующих белков в гемолимфе, льдонуклеирующий потенциал которых максимален в зимний период. Сезонные изменения концентрации полиолов в гемолимфе влияют на величину температуры переохлаждения, которая выше весной, чем в зимний период. Летом жуки чувствительны к температурам ниже их температур переохлаждения ($-7,3^{\circ}\text{C}$), однако их толерантность к замерзанию возрастает в течение осени, начиная с августа; в декабре нижняя летальная температура находится в области ниже -83°C . Изменения в степени морозотолерантности тесно связаны с сезонными изменениями в активности и концентрации льдонуклеаторов, а также полиолов.

Ключевые слова: *Upis ceramboides*, льдонуклеирующие белки, температура переохлаждения, осмоляльность гемолимфы, льдонуклеирующий потенциал.

Стратегія холодостійкості *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae) заснована на толерантності до замерзання, яка дозволяє даному виду мешкати в екстремально холодному кліматі Якутії. Морозотолерантність зумовлена наявністю льдонуклеюючих білків у гемолімфі, льдонуклеюючий потенціал яких максимальний у зимовий період. Сезонні зміни концентрації поліолів у гемолімфі впливають на величину температури переохолодження, яка вища весною, ніж в зимовий період. Влітку жуки чутливі до температур нижче їхніх температур переохолодження ($-7,3^{\circ}\text{C}$), але їх толерантність до замерзання зростає на протязі осені, починаючи з серпня; у січні нижня летальна температура знаходиться в межах нижче -83°C . Зміни в ступені морозотолерантності тісно пов'язані з сезонними змінами в активності та концентрації льдонуклеаторів, а також поліолів.

Ключові слова: *Upis ceramboides*, льдонуклеючі білки, температура переохолодження, осмоляльність гемолімфи, льдонуклеюючий потенціал.

Strategy of cold resistance of *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae) is based on tolerance to freezing, enabling this species to inhabit in extremely cold climate of Yakutia. Frost-tolerance is stipulated by the presence of ice-nucleating proteins in hemolymph, ice-nucleating potential of those are maximum in winter period. Seasonal changes of concentration of polyols in hemolymph affect the value of supercooling temperature, which is higher in spring than in winter. In summer the beetles are sensitive to the temperatures lower than those of their supercooling (-7.3°C), but their tolerance to freezing increases during autumn, starting from August; in December the lower level of lethal temperatures is within the range below -83°C . The changes in the level of frost-tolerance are tightly related to the seasonal changes in activity and concentration of ice nucleators, as well as polyols.

Key words: *Upis ceramboides*, ice-nucleating proteins, supercooling temperature, hemolymph osmolality, ice-nucleating potential

Холодоустойчивые насекомые Якутии, в экстремально холодном регионе Земли, используют как морозотолерантную, так и морозоизбегающую стратегии, но первая, вероятно, более предпочтительна, поскольку позволяет им выживать в условиях данного региона [1].

В большинстве случаев адаптации, формирующие основу стратегии морозотолерантности, связаны с продукцией и выделением льдонуклеирующих соединений во внеклеточную жидкость – белков, которые отвечают за гетерогенную нуклеацию при температуре немного ниже 0°C . Принято считать, что функция этих соединений заклю-

Cold resistant insects of Yakutia, an extremely cold region of the Earth, use both frost-tolerance and frost-avoidance strategies, but the first one is likely more preferable because it allows their survival under conditions of this region [1].

In the major cases the adaptations forming the basis of the frost-tolerance strategy are related to the production and release of ice-nucleating compounds into extracellular liquid: proteins responsible for heterogeneous nucleation at the temperature slightly below zero. It is generally accepted that the function of these compounds consists in inhibiting lethal intracellular freezing by means of the controlled transformation of

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН,
г. Якутск

* Адрес для корреспонденции: пр. Ленина, 41, Якутск, Россия
677980; электронная почта: li_natalia@mail.ru

Institute of Biological Problems of Cryolithozone of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russia

* Address for correspondence: 41, Lenina ave., Yakutsk, Russia
677980, e-mail: li_natalia@mail.ru

чается в ингибировании летального внутриклеточного замерзания путем контролируемого превращения внеклеточной жидкости в лед [3]. Предполагают, что они способствуют организации водных молекул в льдоподобную конфигурацию, что повышает вероятность образования кристаллов льда при таких температурах [13].

Процесс льдообразования во внеклеточной среде сопровождается повышением концентрации солей до токсических уровней, изменением объема клеток вследствие произвольного оттока внутриклеточной жидкости в замерзшую окружающую среду [7]. По этой причине насекомые вырабатывают значительное количество полиолов, которые осуществляют криопротекцию организма, предотвращая тем самым разрушительные последствия льдообразования. В большинстве случаев они продуцируют глицерол [15]. Кроме того, описаны насекомые, вырабатывающие сорбитол и трейтол [9], а также этиленгликоль [4].

Следует отметить, что стратегия морозотолерантности характерна также для насекомых, обитающих в теплых регионах Южного полушария [11]. Несмотря на мягкий климат, температура в этой части Земли нестабильна, наблюдаются частые и кратковременные заморозки, после которых вновь устанавливается положительная температура. При таких непредсказуемых условиях льдонуклеация позволяет насекомым замерзать, а затем оттаивать без повреждения тканей и органов. В данном случае местом льдонуклеации является кишечник, в котором нуклеирующие частицы иницируют кристаллизацию у питающихся насекомых при понижении температуры немного ниже нуля. Поскольку зима в таких регионах Южного полушария мягкая, насекомые не развивают экстенсивную сезонную холодоустойчивость. Такой тип толерантности к замерзанию является неспецифическим и обусловлен действием экзогенных льдонуклеаторов неспецифической природы.

Насекомые, обитающие в экстремально холодных областях, подобных Якутии, по-видимому, используют более специализированные стратегии. Вероятно, толерантность к замерзанию у них обусловлена биосинтезом эндогенных нуклеаторов, являющихся продуктом эволюционного отбора. В этом смысле льдонуклеаторы можно рассматривать как компоненты специфической адаптации к замерзанию [14].

Известно, что биологическая активность льдонуклеаторов значительно отличается и изменяется в зависимости от их природы, осмоляльности среды, количества нуклеирующих агентов [13]. В настоящее время появились сведения о том, что молекулы белковых нуклеаторов являются динамич-

extracellular liquid into ice [3]. There is the supposition that they contribute to the organization of aqueous molecules into ice-like configuration, thereby increasing the probability of ice crystal formation at these temperatures [13].

The process of ice formation in extracellular medium is accompanied with the rise in concentration of salts up to toxic levels, the changes in cell volume due to the random outflow of liquid into frozen environment [7]. Due to this reason the insects produce significant amount of polyols, performing the cryoprotection of an organism, thereby preventing the destructive consequences of ice formation. In the majority of cases they produce glycerol [15]. In addition, there have been described the insects producing sorbitol and threitol [9], as well as ethylene glycol [4].

It should be noted that the strategy of frost-tolerance is characteristic also for the insects inhabiting in warm regions of the Southern hemisphere [11]. In spite of mild climate the temperature in this part of the Earth is not stable, there are observed frequent and short-term frosts after those the positive temperature is again setting. Under such non-predictable conditions the ice nucleation allows the insects to freeze and then thaw without damages in tissues and organs. In this case the site of ice nucleation is bowel, wherein nucleating particles initiate crystallization in feeding insects at lowering of the temperature a little bit below zero. Since winter in these regions of the Southern hemisphere is mild the insects do not develop an extensive seasonal cold resistance. This type of tolerance to freezing is non-specific and is stipulated with the effect of exogenous ice nucleators of non-specific origin.

The insects inhabiting in extremely cold regions similar to Yakutia probably use more specialized strategies. Their tolerance to freezing is likely stipulated with biosynthesis of endogenous nucleators being the product of evolutionary selection. In this sense ice nucleators may be considered as the components of specific adaptation to freezing [14].

It is known that biological activity of ice nucleators significantly differs and varies depending on their origin, osmolality of the medium, amount of ice nucleating agents [13]. There are recent data that the molecules of ice nucleator proteins are dynamic structures with an ability to polymerization and depolymerization, determining their ice-nucleating potential [12].

Ice nucleators in insects were discovered more than 30 years ago, however, there is a lack of information on the properties and functional peculiarities of these compounds, produced by insects inhabiting under the conditions of extremely cold climate. Probably, the necessity of adaptation to such severe climatic conditions resulted in the production by these insects of the most effective specific ice nucleators, the study of

ными структурами, обладающими способностью к полимеризации и деполимеризации, что определяет их льдонуклеирующий потенциал [12].

Льдонуклеаторы у насекомых были открыты более 30 лет назад, однако информации о свойствах и особенностях функционирования этих соединений, продуцируемых насекомыми, обитающими в условиях экстремально холодного климата очень мало. Возможно, необходимость адаптации к столь суровым климатическим условиям привела к продукции данными насекомыми наиболее эффективных специфических льдонуклеаторов, изучение которых позволит лучше понять стратегию морозотолерантности в целом.

Цель работы – изучение льдонуклеирующего потенциала гемолимфы голоарктического вида *Upis ceramboides*, широко распространенного в березовых лесах Якутии.

В работе приведены результаты изучения сезонных различий в льдонуклеирующей активности гемолимфы *U. ceramboides*, а также некоторые физиологические характеристики их холодоустойчивости. Поскольку в литературе отсутствует информация по этой проблеме, в работе представлены данные базовых исследований, на основе которых могут быть проведены последующие более глубокие эксперименты по изучению льдонуклеирующих белков морозотолерантных насекомых.

Материалы и методы

Объектом исследования были жуки *U. ceramboides* (*Coleoptera: Tenebrionidae*), зимующие под корой погибших деревьев (береза, сосна) обычно выше снежного покрова, поэтому в зимнее время они подвержены воздействию экстремально низких температур ($-45...-55^{\circ}\text{C}$).

Насекомых (имаго) собирали летом, а также ранней и поздней осенью. Насекомых, собранных в окрестности г. Якутска в сентябре 2007 г., содержали зиму в условиях, сходных с природными. Для экстремально холодного климата Якутии характерны длинные (с октября по апрель), темные и очень холодные зимы. Этот период насекомые проводят в состоянии диапаузы. Если насекомых перенести с открытого воздуха, температура которого достигает $-47...-50^{\circ}\text{C}$, в холодную камеру с температурой 0°C , то их способность к координированному движению восстановится примерно в течение 24 ч.

Весной температура окружающей среды варьирует от -5 до 4°C , поэтому до начала экспериментов для стабилизации организма насекомых содержали в течение 8 ч при постоянной температуре (4°C). Для эксперимента отбирали только живые экземпляры.

which allows the deeper understanding of frost-tolerance in a whole.

The research aim is to investigate ice-nucleating potential of hemolymph of holarctic species *Upis ceramboides* widely spread in birch forests of Yakutia.

This paper represents the results of the study of seasonal differences in ice-nucleating activity of *U. ceramboides* hemolymph as well as some physiological characteristics of their cold resistance. Since there is no information in available literature on this problem, the paper involves the data of basic studies, which could be the basis of more profound experiments on investigation of ice-nucleating proteins of frost-tolerant insects.

Materials and methods

The research object was the beetles *U. ceramboides* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) overwintering under the bark of dead trees (birch, pine) usually higher than the snow cover is, therefore in winter they are subjected to the effect of extremely low temperatures ($-45...-55^{\circ}\text{C}$).

The insects (imago) were collected in summer as well as during early and late autumn. The insects collected in the vicinity of Yakutsk city in September 2007 were maintained during winter in the conditions similar to natural ones. Extremely cold climate of Yakutia is notable by the long (from October to April) dark and very cold winters. This period is spent by insects in diapause state. If the insects are transferred from an open air, the temperature of which reaches $-47...-50^{\circ}\text{C}$, into a cold chamber with the temperature of 0°C , then their ability to coordinated movement will recover approximately within 24 hrs.

The environmental temperature in spring varies from -5 to 4°C , therefore prior to the experiments to stabilize the organism the insects were maintained at constant temperature (4°C). Only alive individuals were chosen.

Summer and autumn individuals were preliminarily incubated at 4°C for 4 hrs to clean the bowel.

In the experiments hemolymph of insects was derived by capillary method on April 4th, July 10th, August 17th and December 20th 2008.

For the experiments there was used the lowest temperature (-83°C), which can be obtained under our laboratory conditions. The insects were stepwise cooled prior to their incubation at this temperature. Five individuals were taken from their hibernating sites within the period when air temperature reached -42°C . Under these conditions the beetles were carefully placed into a plastic box, located inside thermo-insulated packing to avoid extra-rapid cooling of the insects down to -83°C . Then the insects were transferred into refrigerating chamber with the temperature of -83°C for 3 hr

Летних и осенних особей также предварительно инкубировали при температуре 4°C в течение 4 ч для очищения кишечника.

В экспериментах гемолимфу насекомых получали капиллярным методом 4 апреля, 10 июля, 17 августа и 20 декабря 2008 г.

Для экспериментов использовали самую низкую температуру (–83°C), которую можно получить в наших лабораторных условиях. Инкубации насекомых при данной температуре предшествовало их поэтапное охлаждение. Пять особей были взяты с их зимовочных мест в период, когда температура воздуха достигала –42°C. При данных условиях жуки осторожно были помещены в пластиковый бокс, находящийся внутри термоизоляционной упаковки, во избежание чрезмерно быстрого охлаждения насекомых до –83°C. Затем насекомые были перенесены в рефрижераторную камеру с температурой –83°C для 3-часовой инкубации. По истечении данного времени бокс с насекомыми осторожно перенесли на 1 ч на открытый воздух при температуре –40...–43°C. Бокс поместили на ночь в морозильную камеру при –24°C, после чего насекомых переносили в верхнюю камеру холодильника и выдерживали при 0°C в течение 3-х суток. Жизнеспособность насекомых оценивали по их способности к активному координированному движению.

Образцы гемолимфы насекомых получали путем прокалывания брюшка тонким стеклянным капилляром [17]. При этом гемолимфа под действием капиллярных сил поступала в капилляр. Чтобы предотвратить испарение и окисление гемолимфы, образцы изолировали внутри капилляра каплями минерального масла. Для приготовления образца разбавленной гемолимфы 0,5 мкл нативной гемолимфы посредством специально изготовленного микрошприца вносили в тонкий капилляр, содержащий 4,5 мкл раствора NaCl определенной осмоляльности.

Температуру переохлаждения насекомых в диапазоне 0...–25°C измеряли с помощью термодпары, соединенной с самописцем. При этом конец термодпары был плотно прижат к телу насекомого. Температуру переохлаждения определяли по экзотермическому эффекту, сопровождающему переход гемолимфы насекомого из жидкого состояния в твердое [6].

Осмоляльность гемолимфы жуков определяли по температуре плавления с помощью осмометра ("Clifton Nanolitre"), как описано в [16].

Гемолимфу объемом 5–10 нл, приготовленную описанным выше способом, наносили на поверхность пор измерительных ячеек, которые предварительно загружали минеральным маслом посредством специально изготовленного для этих целей

long incubation. Afterwards the box with the insects was carefully removed for 1 hr on an open air at the temperature of –40...–43°C. The box was placed overnight into a freezing chamber at –24°C and later the insects were put into upper chamber of the fridge and maintained at 0°C for 3 days. Viability of insects was assessed on their ability to active coordinated movement.

The samples of hemolymph were derived by means of pinning the abdomen with thin glass capillary [17]. Herewith hemolymph under the effect of capillary forces entered into a capillary. To prevent the evaporation and oxidation of hemolymph the samples were isolated inside the capillary by means of mineral oil drops. To prepare the sample of diluted hemolymph 0.5 ml of native hemolymph was placed by specially prepared micro-syringe into a thin capillary containing 4.5 ml NaCl solution of the certain osmolality.

The supercooling temperature of the insects within the range of 0...–25°C was measured by means of thermocouple connected to a recorder. Herewith the end of thermocouple was tightly pressed to a insect body. Supercooling temperature was examined on exothermal effect, accompanying the transition of insect's hemolymph from a liquid state into a solid one [6].

Beetle hemolymph osmolality was found on the temperature of melting with the osmometer (Clifton Nanolitre) as described in [16].

Hemolymph of 5–10 nl volume prepared as above-mentioned was layered to the surface of the pores of measuring wells, preliminarily loaded with mineral oil by means of specially designed for this aim micro-syringe. The well was cooled down to the moment of the sample freezing in it, afterwards it was slowly thawed. The temperature at which the last smallest crystal disappeared was assumed as melting temperature.

The samples of native and denaturated at 100°C hemolymph were used in the research. Supercooling temperature of these samples was examined by capillary method.

Using the above described method there was measured ice-nucleating activity in winter and spring samples of beetle hemolymph. To obtain statistically significant results in each case 50 measurements were done.

To examine specific ice-nucleating activity the hemolymph was stepwise diluted 10 times (factor 10) in 5 µl 0.9 NaCl solution [18]. Supercooling temperature of the diluted hemolymph samples as the criterion of specific ice-nucleating activity was recorded by means of thermocouple connected to the recording gauge. Before the measurement the capillary with hemolymph was centrifuged at 3000 rpm during 2 min to remove hemocytes. Measuring was done simultaneously for 4 samples.

микрошприца. Ячейку охлаждали до момента заморозания образца в ней, после чего его медленно отогревали. Температуру, при которой исчезал последний самый маленький кристалл, принимали за температуру плавления.

В работе использовали образцы нативной и денатурированной при 100°C гемолимфы. Температуру переохлаждения данных образцов определяли капиллярным методом.

По описанному выше методу измеряли льдонуклеирующую активность в зимних и весенних образцах гемолимфы жуков. Для получения статистически достоверных результатов в каждом случае было проведено по 50 измерений.

Для определения специфической льдонуклеирующей активности гемолимфу поэтапно разводили в 10 раз (фактор 10) в 5 мкл 0,9%-го раствора NaCl [18]. Температуру переохлаждения разбавленных образцов гемолимфы как критерий специфической льдонуклеирующей активности регистрировали с помощью термодары, соединенной с регистрационным счетчиком. Перед измерением капилляр с гемолимфой центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2 мин для удаления гемоцитов. Измерение проводили одновременно для 4-х образцов.

С помощью универсальной лакмусовой бумаги определяли приблизительное значение pH гемолимфы *U. ceramboides*, которое составляло 7,0. Поэтому оптимум pH для льдонуклеирующей активности гемолимфы исследовали в 0,1 М Na-фосфатном буфере с pH 6,0–8,0. В работе также применяли капиллярный метод определения льдонуклеирующей активности.

В качестве контрольного образца использовали капилляр, содержащий 5 мкл соответствующего буфера. Температуру переохлаждения данного образца измеряли так же, как и температуру переохлаждения насекомых.

Опытный образец содержал 0,5 мкл гемолимфы *U. ceramboides* в 4,5 мкл соответствующего буфера. Максимальная льдонуклеирующая активность определяли как разность между опытным и контрольным значениями температуры переохлаждения.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури, как описано в [5]. Перед измерениями образцы зимней и весенней гемолимфы разводили физиологическим раствором в 20, осенней – 10 и летней – 5 раз.

В работе использовали метод ANOVA со статистическим пакетом SAS.

Результаты и обсуждение

U. ceramboides (Coleoptera: Tenebrionidae) – крупные жуки массой до 373 мг, относящиеся к морозотолерантным видам [2]. Зима в Централь-

Using multi-purpose lackmus paper there was found an approximate pH value of *U. ceramboides* hemolymph, which made 7.0. Therefore the optimum of pH for hemolymph ice-nucleating activity was studied in 0.1 M Na-phosphate buffer with pH 6.0–8.0. In the work there was applied capillary method of examining the ice-nucleating activity.

Capillary with 5 µl of corresponding buffer served as the control sample. The supercooling temperature of this sample was found in the same way as the supercooling temperature of the insects.

The experimental sample contained 0,5 µl hemolymph of *U. ceramboides* in 4.5 µl of corresponding buffer. The maximum ice-nucleating activity was the difference between the experimental value of supercooling temperature and the the control one.

Protein concentration was found by Lowry method as described in [5]. Prior to measurements the samples of winter and spring hemolymph were diluted with physiological solution 20 times, 10 times for autumn, and 5 times for summer one.

In the research the ANOVA method with statistical software SAS was used.

Results and discussion

U. ceramboides (Coleoptera: Tenebrionidae) are large beetles of 373 mg mass referred to frost-tolerant species [2]. The winter in Central Yakutia is characterized by extremely low temperature. Snowline is usually thin so the beetles in such conditions are less protected from extremely low temperatures [10] which during a recent decade have been registered within the temperature range –45...–49°C (rarely down to –55°C) during two and more weeks.

According to the Miller's data *U. ceramboides* inhabitant in Alaska is highly cold resistant species due to its producing of two cryoprotectants: sorbitol and threitol [9]. This species is frost-tolerant with an average supercooling temperature of –6°C during the whole year and as the author notes there were not revealed any seasonal changes of cooling temperature in spite of occurring changes in hemolymph. The beetles showed the sensitivity to cooling rate and survived at –60°C, the lowest temperature that may be obtained in laboratory [9].

In these investigations *U. ceramboides* beetles were resistant to 3-hour exposure at –83°C and then were successfully reactivated during 3 days. Thus lethal temperature for Yakutian population of *U. ceramboides* is the one below –83°C.

As it was mentioned one of the principles of insect freezing tolerance is the production of endogenous ice nucleators. According to the Lundheim's classification there are distinguished 2 types of ice nucleators, adaptive and random [8].

It has been established that adaptive ice nucleators produced by frost-tolerant insects are of protein natu-

ной Якутии характеризуется очень низкой температурой. Снежный покров обычно тонкий, поэтому жуки в таких условиях менее защищены от экстремально низких температур [10], которые в последнее десятилетие регистрируются в области $-45 \dots -49^\circ\text{C}$ (в редких случаях до $-50 \dots -55^\circ\text{C}$) в течение двух и более недель.

В соответствии с данными L.K. Miller *U. ceramboides*, обитающий на Аляске, является высокохолодоустойчивым видом благодаря продуцированию им двух криопротекторов: сорбитола и тритола [9]. Данный вид является морозотолерантным со средней температурой переохлаждения в течение всего года -6°C и, как отмечает автор, не было выявлено каких-либо сезонных изменений температуры переохлаждения, несмотря на происходящие изменения в гемолимфе. Жуки проявляли чувствительность к скорости охлаждения и выжили при температуре -60°C – самой низкой температуре, которую можно получить в лаборатории [9].

В данных исследованиях жуки *U. ceramboides* были устойчивы к 3-часовой экспозиции при -83°C и затем проходили успешную реактивацию в течение 3-х суток. Таким образом, летальной для якутской популяции *U. ceramboides* является температура ниже -83°C .

Как было отмечено выше, одним из принципов стратегии морозотолерантности насекомых является продукция эндогенных льдонуклеирующих агентов. В соответствии с классификацией R. Lundheim, различают два типа льдонуклеаторов: адаптивные и случайные [8].

Установлено, что адаптивные льдонуклеаторы, продуцируемые морозотолерантными насекомыми, имеют белковую природу. Они появляются в гемолимфе в период подготовки насекомых к диапаузе. Предполагают, что летом льдонуклеирующие белки либо исчезают, либо “маскируются” в мембранных структурах [15]. Случайные льдонуклеаторы инициируют спонтанное льдообразование и не защищают от холодового повреждения насекомых, обитающих в экстремально холодных регионах.

В настоящее время критерием активности нуклеаторов является температура, при которой происходит кристаллизация жидкости, ее принято называть температурой переохлаждения системы. Как было показано K.E. Zachariassen, повышение концентрации осмотически активных растворов понижает температуру, при которой биологические льдонуклеаторы вызывают замерзание в системе. Коэффициент депрессии активности обычно примерно эквивалентен коллигативной депрессии температуры плавления, величина которой составляет $1,86^\circ\text{C}/\text{Осмоль}$. Известно, что накопление полиолов оказывает умеренное влияние на льдонуклеирующую активность [13]. Поэтому на температуру пере-

ре. They appear in hemolymph when insects are preparing to diapause. It is suggested, that in summer the ice nucleation proteins either disappear or are "masked" in membrane structures [15]. Random ice nucleators initiate a spontaneous ice formation and do not protect from a cold damage the insects inhabitant in extremely cold regions.

Nowadays the criterion of nucleator activity is the temperature at which crystallization of liquids occurs, it is called as the system supercooling temperature. As Zachariassen showed, the rise in concentration of osmotically active solutions lowered the temperature at which biological ice nucleators caused the freezing in a system. Coefficient of active depression is usually approximately equal to colligative depression of melting temperature, the value of which makes $1.86^\circ\text{C}/\text{Osmol}$. It is known, that accumulation of polyols moderately affects the ice nucleation activity [13]. So polyols will affect the supercooling point and in this sense it is not an exact measure of nucleating activity in a whole.

It has been shown that supercooling temperature of *U. ceramboides* is exposed to seasonal fluctuations [2]. Statistically significant data confirm that in winter the ice-nucleating activity of beetle hemolymph is significantly lower than in spring ($p < 0.001$). Fig. 1 shows the distribution of nucleating temperatures during dilution of $0.5 \mu\text{l}$ hemolymph in $4.5 \mu\text{l}$ of 0.9% NaCl solution. The most ice nucleators with activity at -8.5°C are present in spring samples. Significant number of ice nucleators with supercooling point of -10.5°C was noted in hemolymph of winter beetles *U. ceramboides*.

In winter period the hemolymph osmolality is higher (Table). Polyols probably stipulate the depression of insect supercooling temperature, so during this period the hemolymph is characterized by a moderate nucleating activity. Generally, there is an obvious correlation between supercooling temperature and value of hemolymph osmolality, varying depending on the season of a year (Fig. 2).

Ice-nucleating activity is the function of quantitative content of ice-nucleating agents. The samples, containing the same number of ice nucleators, have the same supercooling temperature [19]. The present investigation shows that an ice-nucleating activity is associated with certain protein fraction. If hemolymph fraction will be boiled or treated by protease, the supercooling point lowers from -8 to -11°C testifying to the loss of ice-nucleating activity.

As there is no method for studying the single molecules of ice-nucleating proteins, the information about its amount in hemolymph was obtained during assessment of total protein content, that is only an indirect indication of quantitative content of these compounds. Nevertheless, this information allows the obtaining of initial notion about the dependence between protein concentration in hemolymph and supercooling temperature.

охлаждения будут влиять полиолы и в этом смысле температура переохлаждения является не совсем точной мерой нуклеирующей активности в целом.

Показано, что температура переохлаждения *U. ceramboides* подвержена сезонным колебаниям [2]. На статистически достоверном материале подтверждено, что в зимний период льдонуклеирующая активность гемолимфы жука действительно ниже, чем весной ($p < 0,001$). На рис. 1 показано распределение нуклеационных температур при разведении 0,5 мкл гемолимфы в 4,5 мкл раствора 0,9% NaCl. Большинство льдонуклеаторов с активностью $-8,5^{\circ}\text{C}$ присутствует в весенних образцах. Значительное количество льдонуклеаторов с температурой переохлаждения $-10,5^{\circ}\text{C}$ было обнаружено в гемолимфе зимних жуков *U. ceramboides*.

В зимний период осмоляльность гемолимфы более высокая (таблица). Полиолы, вероятно, обуславливают некоторую депрессию температуры переохлаждения насекомого, поэтому в этот период гемолимфа характеризуется умеренной нуклеационной активностью. В целом существует очевидная корреляция между температурой переохлаждения и величиной осмоляльности гемолимфы, которая варьирует в зависимости от сезона года (рис. 2).

Льдонуклеирующая активность является функцией количественного содержания льдонуклеирующих агентов. Образцы, содержащие одинаковое количество льдонуклеаторов, имеют одинаковую температуру переохлаждения [19]. В настоящем исследовании показано, что льдонуклеирующая активность связана с определенной белковой фракцией. Если образец гемолимфы прокипятить или обработать протеазой, то температура переохлаждения понижается от -8 до -11°C , что свидетельствует о потере льдонуклеирующей активности.

Поскольку методика работы с индивидуальными молекулами льдонуклеирующих белков не

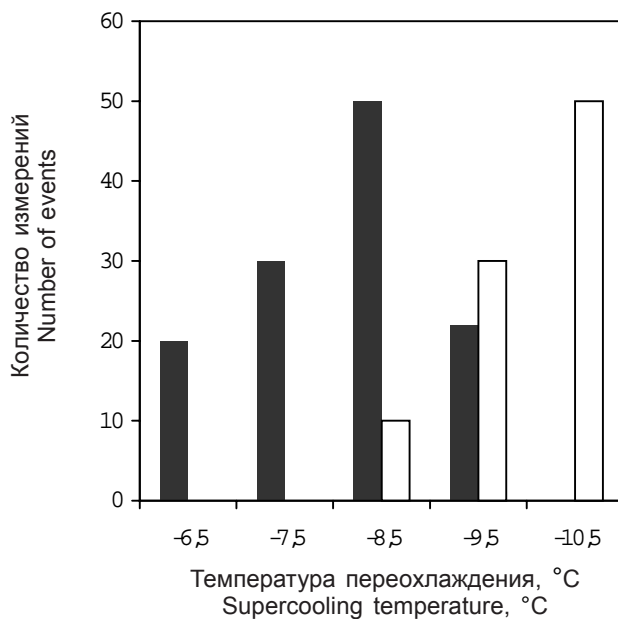


Рис. 1. Сезонное изменение в льдонуклеирующей активности (выражена как температура переохлаждения) гемолимфы *U. ceramboides*: ■ – весна; □ – зима; различия между зимним и весенним максимумами температур переохлаждения статистически значимы, $p < 0,001$.

Fig. 1. Seasonal changes in ice-nucleating activity (expressed as supercooling temperature) in *U. ceramboides* hemolymph: ■ – spring; □ – winter; changes between supercooling temperature maxima are statistically significant, $p < 0.001$.

As Fig. 3 shows there is a positive correlation between supercooling temperature and concentration of protein in the samples of winter and spring hemolymph ($R^2 = 0.317$). Basing on these data a specific ice-nucleating activity was estimated (Fig. 4), herewith the dependence between specific ice-nucleating activity and concentration of protein had a significant character with correlation coefficient $R^2 = 0.928$.

In spring the correlation coefficient is higher than in winter. In spring a photoperiod "triggers" the process of polyol utilization, and on the background of their concentration lowering the ice-nucleating activity rises, probably affecting the degree of evidence of correlative dependence between these parameters. It was established from experimental data that correlation coefficient of spring beetles is higher than of the winter ones (see Fig. 3, a) while summer beetles *U. ceramboides* had a negative coefficient (Fig. 3, b). The content of protein in summer hemolymph is significantly lower than in other seasons (Table). Obviously the concentration of ice-nucleating proteins is not significant and major part of ice-

Изменение физиологических параметров гемолимфы *U. ceramboides* в течение года
Changes in *U. ceramboides* hemolymph physiological parameters during a year

Сезон Season	Температура переохлаждения, °C Supercooling temperature, °C	Осмоляльность, мОсмоль Osmolarity, mOsmol	Концентрация белка, мг/мл Protein concentration, mg/ml
Зима Winter	$-10,5 \pm 1,2$	550 ± 25	117 ± 19
Весна Spring	$-8,5 \pm 0,8$	310 ± 18	106 ± 11
Лето Summer	$-7,7 \pm 0,2$	150 ± 14	45 ± 26
Осень Autumn	$-7,8 \pm 0,15$	432 ± 10	$56,8 \pm 15$

разработана, то информация об их количестве в гемолимфе была получена при оценке общего содержания белка, что является только косвенным указанием на количественное содержание данных соединений. Тем не менее эта информация позволяет получить первоначальное представление о зависимости между концентрацией белка в гемолимфе и температурой переохлаждения.

Как видно на рис. 3, существует положительная корреляция между температурой переохлаждения и концентрацией белка в образцах зимней и весенней гемолимфы ($R^2 = 0,317$). На основе этих данных была вычислена удельная льдонуклеирующая активность (рис. 4), при этом зависимость между удельной льдонуклеирующей активностью и концентрацией белка имела достоверный характер с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,928$.

Весной коэффициент корреляции выше, чем зимой. Весной фотопериод “запускает” процесс утилизации полиолов, на фоне их понижающейся концентрации льдонуклеирующая активность растет, что, вероятно, влияет на степень выраженности коррелятивной зависимости между этими параметрами. Из экспериментальных данных установлено, что коэффициент корреляции у весенних жуков выше, чем у зимних (см. рис. 3, а), в то время как у летних жуков *U. ceramboides* он был отрицательный (рис. 3, б). Содержание белка в летней гемолимфе значительно ниже, чем в остальные сезоны (таблица). По-видимому, концентрация льдонуклеирующих белков незначительна и существенная доля льдонуклеирующей активности обусловлена

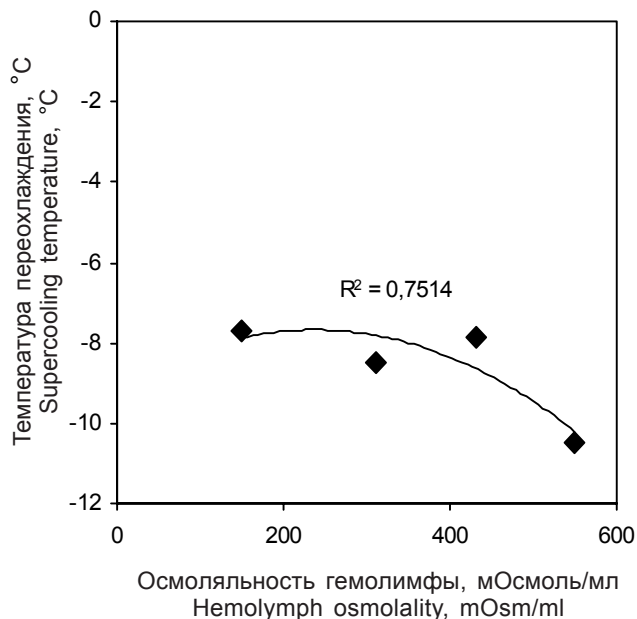
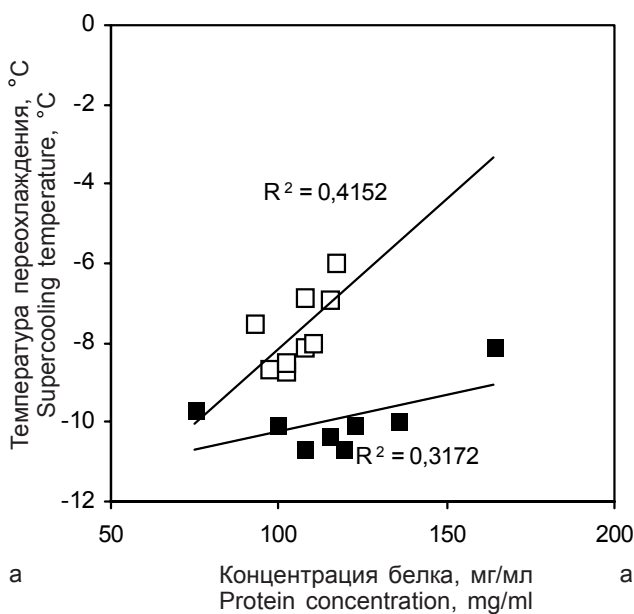


Рис. 2. Зависимость температуры переохлаждения от осмоляльности гемолимфы *U. ceramboides* (каждая точка представлена как среднее значение 4 параллельных измерений).

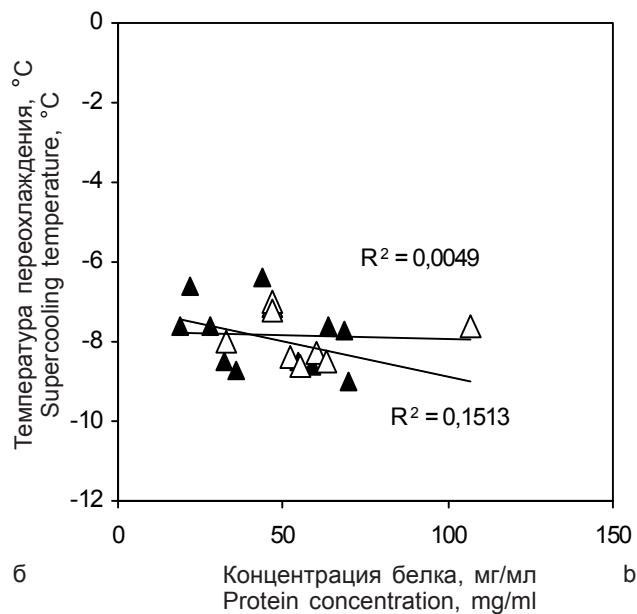
Fig. 2. Supercooling temperature dependence on *U. ceramboides* hemolymph osmolality (each point is an average of 4 simultaneous measurements).

nucleating activity is stipulated by random ice nucleators. In such an amount the nucleator proteins are not able to perform a cryoprotective function and as this investigation showed the insects died if they were frozen, *i. e.* in summer they were not frost-tolerant. In addition, a supercooling temperature of summer hemo-



а

Концентрация белка, мг/мл
Protein concentration, mg/ml



б

Концентрация белка, мг/мл
Protein concentration, mg/ml

Рис. 3. Взаимосвязь между температурой переохлаждения и концентрацией белка в гемолимфе *U. ceramboides*: а – зима (■) и весна (□); б) лето (▲) и осень (△).

Fig. 3. Relation between supercooling temperature and protein concentration in *U. ceramboides* hemolymph: а – winter (■) and spring (□); б – summer (▲) and autumn (△).

случайными льдонуклеаторами. В таких количествах белки-нуклеаторы не способны выполнять криопротекторную функцию и, как показали данные исследования, насекомые погибают, если замерзают, т. е. в летний период они не являются морозотолерантными. Кроме того, температура переохлаждения летней гемолимфы в среднем составляет $-7,7^{\circ}\text{C}$, после ее обработки при 100°C температура нуклеации понижается всего лишь до $-8,3^{\circ}\text{C}$ (для сравнения см. данные, относящиеся к зимней гемолимфе). При этом температура плавления, а значит и осмоляльность гемолимфы, не изменяются.

При изучении pH-оптимума льдонуклеирующей активности *in vitro* (рис. 5) определена область pH 6,5–7,5, в пределах которой льдонуклеирующая активность гемолимфы *U. ceramboides* максимальна в течение всего года. Возможно, что в течение года в гемолимфе *U. ceramboides* присутствуют льдонуклеаторы одного типа, при этом их содержание и активность значительно изменяются в зависимости от сезона (рис. 5). Эти данные, по-видимому, указывают на то, что в летний период льдонуклеирующие белки адаптивного типа все же присутствуют в гемолимфе, однако из-за следовых количеств они не выполняют криопротекторной функции.

В конце лета концентрация белка в гемолимфе повышается, вместе с ней повышается и концентрация адаптивных льдонуклеаторов, так как в этот период жуки становятся морозотолерантными. Вероятно, содержание льдонуклеирующих белков все еще небольшое, и хотя его достаточно для развития морозотолерантности, корреляции между их количественным содержанием и льдонуклеирующей активностью не выявлено (рис. 3, б).

На рис. 6, а представлена специфическая льдонуклеирующая активность зимних и осенних образцов гемолимфы, которая выражена как температура переохлаждения, являющаяся функцией логарифма фактора разведения. Впервые такое представление специфической активности льдонуклеатора было предложено К.Е. Zachariassen [15]. Как видно, изменение специфической нуклеирующей активности зимнего образца гемолимфы якутского жука в зависимости от разведения имеет достаточно умеренный характер, существует область (“концентрационное плато”), в пределах которой активность льдонуклеаторов практически не изменяется. Из графика видно, что скорость понижения специфической льдонуклеирующей активности осенних образцов гемолимфы *U. ceramboides* в зависимости от ее разведения значительно выше, чем для зимних образцов гемолимфы (см. коэффициент в уравнении). Аналогичные исследования весенних образцов показали, что разбавление

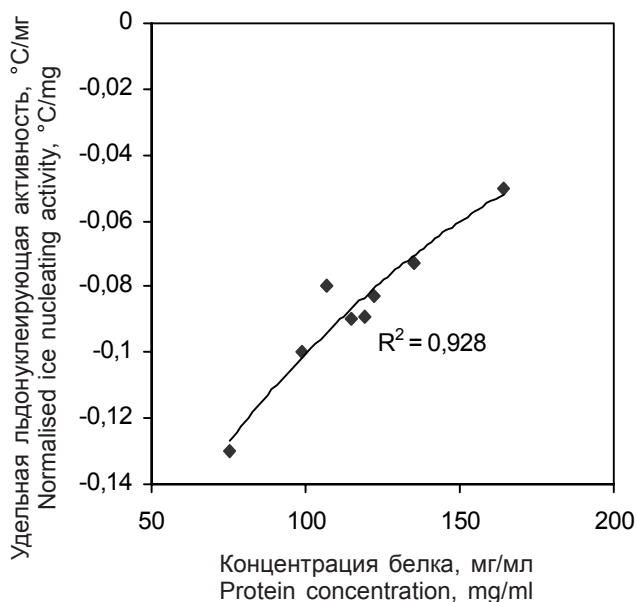


Рис. 4. Взаимосвязь между температурой переохлаждения и удельной льдонуклеирующей активностью зимней гемолимфы *U. ceramboides*.

Fig. 4. Relation between supercooling temperature and normalised ice nucleating activity of *U. ceramboides* winter hemolymph.

lymph in average is -7.7°C ; after its treatment at 100°C the temperature of nucleation lowers only to -8.3°C (for comparing see the data referred to winter hemolymph). Furthermore, the melting temperature and consequently the hemolymph osmolality remain the same.

During *in vitro* investigation of pH optimum of ice-nucleating activity (Fig. 5) the range of pH was deter-

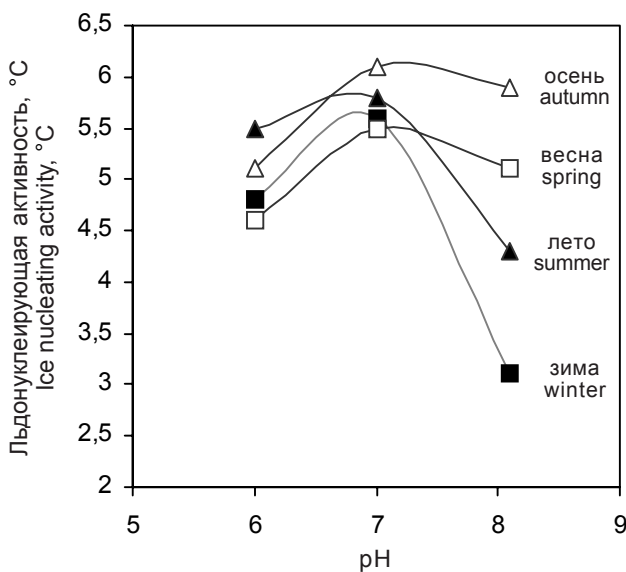


Рис. 5. Льдонуклеирующая активность гемолимфы *U. ceramboides* в зависимости от сезона и pH.

Fig. 5. Ice nucleating activity of *U. ceramboides* hemolymph depending on the season and pH.

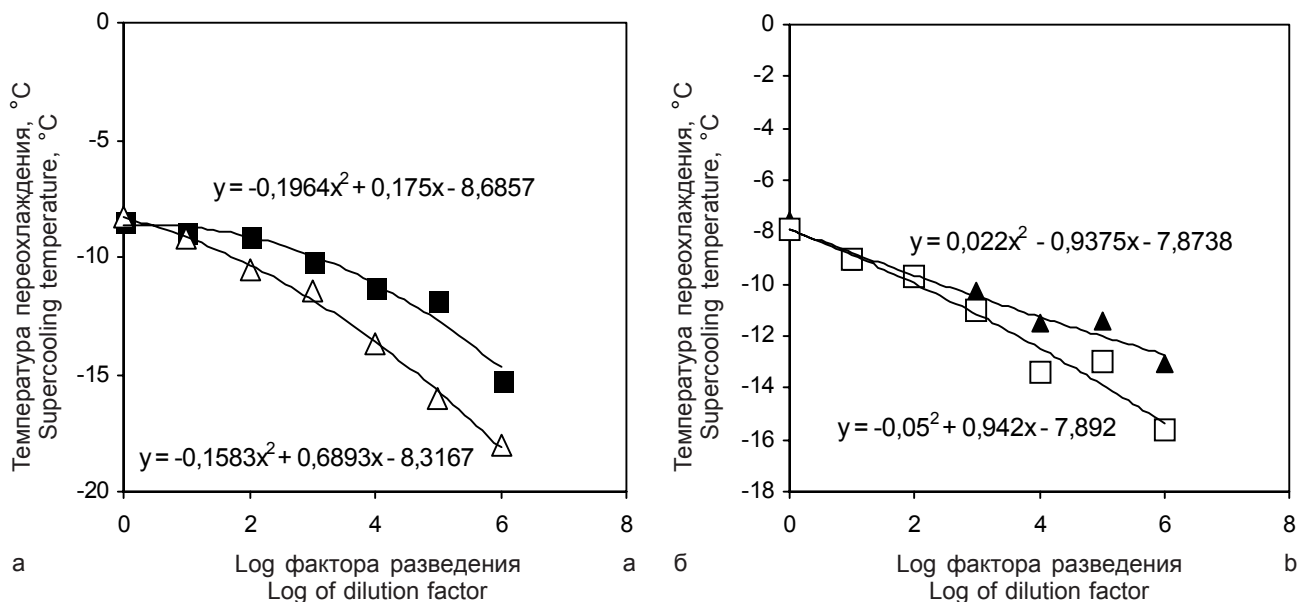


Рис. 6. Специфическая льдонуклеирующая активность 0,5 мкл образцов гемолимфы *U. ceramboides*, разбавленной повторно фактором 10 в 4,5 мкл 0,9% раствора NaCl, представленная как функция фактора разбавления: а – осень (△) и зима (■); б – весна (□) и лето (▲).

Fig. 6. Specific ice nucleating activity of 0.5 µl samples of hemolymph, diluted additionally by factor 10 in 4.5 µl of 0.9% NaCl solution, and expressed as dilution factor function: a – autumn (△) and winter (■); b – spring (□) and summer (▲).

гемолимфы приводит к еще более заметному понижению активности весенних льдонуклеаторов по сравнению с зимними. На рис. 6, б видно, что характер кривой нуклеирующей активности летней гемолимфы не подчиняется общей закономерности, что указывает на преобладание неспецифического нуклеационного механизма. Основным отличием кривой весенней льдонуклеирующей активности по сравнению с зимней является отсутствие “плато” (рис. 6). Причина этого отличия пока не установлена. Физиологические изменения в гемолимфе в период подготовки насекомых к диапаузе, по видимому, способствуют формированию нуклеирующего потенциала “зимнего” типа (рис. 6, а). Несмотря на наблюдаемые изменения физико-химических свойств весенней и осенней гемолимфы *U. ceramboides* по сравнению с зимней, жуки являются морозотолерантными в этот период. Только летом они становятся морозочувствительными.

Выводы

Проведенные исследования впервые выявили наличие эндогенных белковых льдонуклеаторов у представителя семейства *Tenebrionidae* и определили характер сезонных изменений физико-химических свойств его гемолимфы. Будучи морозотолерантным видом, *U. ceramboides* продуцирует высокоэффективные льдонуклеаторы, которые в оптимальной концентрации аккумулируются в гемолимфе в зимний период и обеспечивают контро-

минирование 6.5–7.5, в течение которого льдонуклеирующая активность гемолимфы *U. ceramboides* является максимальной в течение всего года. Возможно, что в течение всего года гемолимфа *U. ceramboides* содержит льдонуклеаторы одного типа, содержание и активность которых значительно варьируют в зависимости от сезона (рис. 5). Эти данные, вероятно, указывают на то, что в летний период льдонуклеирующие белки адаптивного типа все еще присутствуют в гемолимфе, но из-за их следовых количеств они не выполняют криопротекторную функцию.

В конце лета концентрация белка в гемолимфе, а также концентрация адаптивных льдонуклеаторов повышается, и в этот период жуки становятся морозотолерантными. Вероятно, содержание льдонуклеирующей активности все еще невелико, хотя и достаточно для развития морозотолерантности, корреляция между их количественным содержанием и льдонуклеирующей активностью не была выявлена (рис. 3, б).

На рис. 6, а представлена льдонуклеирующая активность зимних и осенних образцов гемолимфы, выраженная как температура переохлаждения в зависимости от логарифма фактора разбавления. Впервые такая презентация данных о льдонуклеирующей активности была предложена Zachariassen [15]. Как видно, изменения льдонуклеирующей активности в зимнем образце якутского жука в зависимости от фактора разбавления имеют довольно мягкий характер, в нем есть область (“плато”), в которой льдонуклеирующая активность практически не меняется. График показывает, что скорость снижения льдонуклеирующей активности в осенних образцах гемолимфы *U. ceramboides* зависи-

лируемое льдообразование с высокой вероятностью. Наряду с синтезом таких криопротекторов, как сорбитол и трейтол, льдонуклеирующие агенты, по-видимому, обуславливают толерантность *U. ceramboides* к низким температурам вплоть до -83°C . Очевидно, что такая высокая холодоустойчивость якутской популяции *U. ceramboides* является результатом эволюционной адаптации к суровым климатическим условиям этого региона, которые предъявляют высокие требования к холодадаптивным стратегиям, развивающимся в направлении их более высокой специализации.

Исследования поддержаны грантом РФФИ "Арктика", проект 06-04-96048

Литература

1. Ли Н.Г., Аверенский А.И. Стратегия холодовой адаптации у насекомых, обитающих в Центральной Якутии // Биофизика.– 2007.– Т. 52, №4.– С. 747–752.
2. Ли Н.Г. Экофизиологические особенности адаптации жуков *Upis ceramboides*, обитающих в Центральной Якутии // Проблемы криобиологии.– 2006.– Т. 16, №3.– С. 310–317.
3. Duman J.G., Wu Ding Wen, Xu Lei et al. Adaptations of insects to subzero temperature // Quart. Rev. Biol.– 1991.– Vol. 66, N4.– P. 387–407.
4. Gehrken U. Winter survival of an adult bark beetle *Upis acuminatus* // J. Insect Physiol.– 1984.– Vol. 30, N4.– P. 421–429.
5. Jones A., Reed R., Weyers J. Practical Skills in Biology.– Pearson Education Limited, 2003.– P. 321.
6. Laak van der S. Physiological adaptations to low temperature in freeze-tolerant Phylloocta laticollis beetles // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N4.– P. 613–621.
7. Lovelock J.E. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // Biochem. Biophys. Acta.– 1953.– N11.– P. 28–36.
8. Lundheim R. Adaptive and incidental biological ice nucleator: Dr. Scient. Thesis.– Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, 1996.–P. 11.
9. Miller L.K. Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance // Nature.– 1975.– N258.– P. 519–520.
10. Osokin N.I., Samoilov R.S., Sosnovskiy A.V., Nikolaev V.N. The variability of a thermo-physical regime of the ground at change of air temperature and snow parameters // Influence of climatic and ecological changes on permafrost ecosystems.– Yakutsk: Publishing House of the Yakutian Branch of SD RAS, 2003.– 165 p.
11. Sinclair B.J., Addo-Bediako A., Chown S.L. Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance // Biol. Rev.– 2003.– Vol. 78.– P. 181–195.
12. Yeung K.L., Wolf E.E., Duman G.A. A scanning tunneling microscopy study of an insect lipoprotein ice nucleator // J. Vac. Sci. Technol.– 1991.– N9.– P. 1197–1201.
13. Zachariassen K.E. Ice nucleating agents in cold hardy insects // Water and Life.– Berlin: Springer Verlag, 1992.– P. 261–281.
14. Zachariassen K.E. Nucleating agents in cold-hardy insects // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N4.– P. 557–562.
15. Zachariassen K.E. Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev.– 1985.– Vol. 65, N4.– P. 799–831.
16. Zachariassen K.E. Seasonal variation in hemolymph osmolality and osmotic contribution of glycerol in adult *Rhagium inquisi-*

ing on its dilution is significantly higher than for winter hemolymph samples (see the coefficient in equation). The same investigations of spring samples showed that dilution of hemolymph led to the more significant activity decrease of spring nucleators unlike the winter ones. Fig. 6, b shows that the character of the curve of summer hemolymph nucleating activity does not follow the general regularity that denotes the predominance of non-specific nucleation mechanism. The main difference of the curve of spring ice-nucleating activity comparing to the winter one is the absence of "plateau" (Fig. 6). The reason of this difference has not been established yet. Physiological changes in hemolymph during the period of preparation to diapauses, probably contribute to the formation of nucleating potential of "winter" type (Fig. 6, a). In spite of observed changes of physical and chemical properties of *U. ceramboides* spring and autumn hemolymph in contrast to the winter one the beetles are freezing-tolerant in this period. Only in summer they become freezing-sensitive.

Conclusions

The carried-out investigations firstly revealed the presence of endogenous protein ice nucleators in the representative of *Tenebrionadae* family and determined the character of seasonal changes in its hemolymph physico-chemical properties. Being a frost-tolerant species, the *U. ceramboides* produces highly effective ice nucleators which are accumulated in optimal concentration in hemolymph during winter and provide controlled ice nucleation with a high probability. Along with the synthesis of such cryoprotectants as sorbitol and threitol, ice nucleators obviously stipulate the tolerance of *U. ceramboides* to the low temperatures down to -83°C . Evidently, such a high freezing tolerance of Yakutian population of *U. ceramboides* is the result of evolutionary adaptation to severe climatic conditions of this region, that make the high demands to the strategies of cold adaptation, becoming more specialized.

The investigations are supported by grant of Russian Foundation of Fundamental Investigations, "Arctics" project 06-04-96048.

References

1. Li N.G., Averkenskiy A.I. Cold adaptation strategy of insects habitant in Central Yakutia // Biofizika.– 2007.– Vol. 52, N4.– P. 747–752.
2. Li N.G. Ecophysiological peculiarities of cold adaptation of *Upis ceramboides* beetles habitant in Central Yakutia // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N3.– P. 310–317.
3. Duman J.G., Wu Ding Wen, Xu Lei et al. Adaptations of insects to subzero temperature // Quart. Rev. Biol.– 1991.– Vol. 66, N4.– P. 387–407.

- tor L. (*Coleoptera Cerambycidae*) // *Norw. J. Entomol.*– 1973.– Vol. 20, N20.– P. 259–262.
17. Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.E. A method for quantitative determination of ice nucleating agents in insect hemolymph // *Cryobiology.*– 1982.– Vol. 19, N2.– P. 180–184.
 18. Zachariassen K.E., Hammel H.T. Nucleating agents in the hemolymph of insects tolerant to freezing // *Nature.*– 1976.– Vol. 262, N5566.– P. 285–287.
 19. Zachariassen K.E., Hammel H.T. The effect of ice-nucleating agents on ice-nucleating activity // *Cryobiology.*– 1988.– Vol. 25, N2.– P. 143–147.
 4. Gehrken U. Winter survival of an adult bark beetle *Upis acuminatus* // *J. Insect Physiol.*– 1984.– Vol. 30, N4.– P. 421–429.
 5. Jones A., Reed R., Weyers J. *Practical Skills in Biology.*– Pearson Education Limited, 2003.– P. 321.
 6. Laak van der S. Physiological adaptations to low temperature in freeze-tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1982.– Vol. 73A, N4.– P. 613–621.
 7. Lovelock J.E. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // *Biochem. Biophys. Acta.*– 1953.– N11.– P. 28–36.
 8. Lundheim R. Adaptive and incidental biological ice nucleator: Dr. Scient. Thesis.– Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, 1996.–P. 11.
 9. Miller L.K. Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance // *Nature.*– 1975.– N258.– P. 519–520.
 10. Osokin N.I., Samoilov R.S., Sosnovskiy A.V., Nikolaev V.N. The variability of a thermo-physical regime of the ground at change of air temperature and snow parameters // *Influence of climatic and ecological changes on permafrost ecosystems.*– Yakutsk: Publishing House of the Yakutian Branch of SD RAS, 2003.– 165 p.
 11. Sinclair B.J., Addo-Bediako A., Chown S.L. Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance // *Biol. Rev.*– 2003.– Vol. 78.– P. 181–195.
 12. Yeung K.L., Wolf E.E., Duman G.A. A scanning tunneling microscopy study of an insect lipoprotein ice nucleator // *J. Vac. Sci. Technol.*– 1991.– N9.– P. 1197–1201.
 13. Zachariassen K.E. Ice nucleating agents in cold hardy insects // *Water and Life.*– Berlin: Springer Verlag, 1992.– P. 261–281.
 14. Zachariassen K.E. Nucleating agents in cold-hardy insects // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1982.– Vol. 73A, N4.– P. 557–562.
 15. Zachariassen K.E. Physiology of cold tolerance in insects // *Physiol. Rev.*– 1985.– Vol. 65, N4.– P. 799–831.
 16. Zachariassen K.E. Seasonal variation in hemolymph osmolality and osmotic contribution of glycerol in adult *Rhagium inquisitor* L. (*Coleoptera Cerambycidae*) // *Norw. J. Entomol.*– 1973.– Vol. 20, N20.– P. 259–262.
 17. Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.E. A method for quantitative determination of ice nucleating agents in insect hemolymph // *Cryobiology.*– 1982.– Vol. 19, N2.– P. 180–184.
 18. Zachariassen K.E., Hammel H.T. Nucleating agents in the hemolymph of insects tolerant to freezing // *Nature.*– 1976.– Vol. 262, N5566.– P. 285–287.
 19. Zachariassen K.E., Hammel H.T. The effect of ice-nucleating agents on ice-nucleating activity // *Cryobiology.*– 1988.– Vol. 25, N2.– P. 143–147.

Поступила 20.11.2010
Рецензент Л.И. Релина

Accepted in 20.11.2010