昆虫温生物学分析方法专题

昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法*

欧阳芳 戈 峰**

（中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101）

摘 要 昆虫抗冻耐寒能力因其理论意义和实践价值成为当前生物学和生态学的重要研究内容。尤其昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析是昆虫低温生物学的热点问题。本文从昆虫生态，及生理生化层面阐述了昆虫抗冻策略和耐寒机制类型。进一步介绍了昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法：一方面，以昆虫种群为对象，分析低温对种群存活的胁迫作用，如低温实验中种群的存活率，致死中温度或致死中时间，冷伤害上限温度，冷害低温总和，以及低温冷伤害的死亡速率等。另一方面，以昆虫个体为对象，测定个体为适应低温环境而采取响应机制，如昆虫个体过冷却点、含水量、能量物质、抗冻小分子物质和抗冻蛋白含量等。在未来，从微观上看随着低温生物学拓展到基因组、转录组、蛋白质组及代谢组层次的研究，从宏观上看随着越冬代昆虫种群数量动态及其迁飞转移行为规律与栖息地微环境气候和区域性景观格局特征等的关系研究，有利于更全面地和深入地了解昆虫类群的抗冻策略或耐寒机制，从而为更系统地建立昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法体系提供可靠指标。

关键词 抗冻耐寒能力，过冷却点，致死中温度，冷伤害上限温度，冷害低温总和

Methodology of measuring and analyzing insect cold hardiness

OUYANG Fang GE Feng**

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The theoretical significance and practical value of insect cold hardiness is increasingly becoming an important part of current biology and ecology studies and the methodology of measuring and analyzing insect cold hardiness is one of the key issues in insect cryobiology. In this article, we first summarize ecological, physiological and biochemical strategies and mechanisms of cold hardiness in insects, then introduce the methodology of measurment and analysis of insect cold hardiness. We describe how to analyse the stress effects of low temperature on the survival of insect populations, such as survival rate, semilethal temperature, duration of exposure to low temperature, the upper limit of the chill injury zone and sum of injurious temperature. We also describe how to measure low temperature adaptive mechanisms of individual insects, for example, supercooling point, moisture content, energy substance, low-molecular-weight polyols and sugars and antifreeze proteins. In the future, research on low temperature biology will extend to the genome, transcriptome, proteome and metabolic levels. From the macroscopic perspective, the relationships between quantitative dynamics, transfer behaviors and migration of overwintering populations and microclimate and regional landscape patterns are becoming increasingly clear. This will be conducive to a more comprehensive and deeper understanding of the strategies and mechanisms of insect cold hardiness. This new information and knowledge coming from the

* 资助项目：“国家重点基础研究发展计划资助（973 计划）”项目（编号 2013CB127604）；国家自然科学基金委项目（31200321）和国家科技支撑计划（编号 2012BAD19B05）

**通讯作者，E-mail: gef@ioz.ac.cn

收稿日期：2014-09-20，接受日期：2014-10-13

genome, transcriptome, proteome and metabolic levels to inform research on insect population ecology and landscape ecology will help establish a more systematic methodology for measuring and analyzing insect cold hardiness.

Key words cold hardiness, supercooling point, semilethal temperature, upper limit of chill injury zone, sum of injufious temperature

1 昆虫抗冻策略与耐寒机制

昆虫是动物界中物种数量最大的类群，其个体数量、生物量和基因数也十分巨大。昆虫广泛分布于热带、亚热带、温带以及极地等地区。非生物环境因子尤其是温度影响昆虫的生存、生长、繁殖、扩散、分布及种群数量动态 (Sinclair *et al.*，2003)。昆虫属于变温动物。外界环境温度是昆虫个体进行积极生命活动和正常新陈代谢过程的重要条件，它决定着昆虫生命过程的特点、趋向和水平。温度的变化可以加速或抑制生物体的代谢过程。

自然界周期性或季节性的低温成为昆虫生存的限制因素并直接影响它的存活。同种或不同物种的昆虫种群在长期进化过程中形成了应对低温环境的各种抗冻策略或耐寒机制。以鳞翅目夜蛾科棉铃虫 *Helicoverpa armigera* HÜbner 种群为例，在行为生态学上，为应对季节性低温的不利影响，分布在中国华北区域黄河流域的一部分第 3 代棉铃虫选择转移迁飞到温度较高的南方地区，躲避秋冬季节低温的不利影响；另一部分选择在本地越冬，其在老龄幼虫阶段爬行到地表面，并在土壤表层作蛹室，为蛹期起到保温作用。在生理生化上，棉铃虫幼虫在越冬之前，摄取足够的食物，储存能量物质和抗冻物质。

抗冻耐寒性定义为生物个体在零下低温下的存活能力（Resh and Cardé，2009)。昆虫的抗冻耐寒性研究早在 1926 年就有报道（Payne，1926)，近几十年来大量的工作研究了低温冷冻对昆虫的影响以及昆虫对低温的响应（Salt，1961；Sinclair *et al.*，2003；Storey and Storey，2012)。昆虫的过冷却是指体液温度下降到冰点以下而不结冰的现象。在温带和寒带地区，冬季温度通常低于冰点，昆虫可以通过体液过冷却的方式来避免结冰造成的伤害。因而在许多昆虫耐寒性的研究中，都以过冷却点（Super-cooling point）为一个重要指标来界定其耐寒性的强弱（Somme，1996)。从生理生化角度来看，目前昆虫的抗冻策略或耐寒机制主要分为 3 大类型（Sinclair *et al.*，2003)：第 1 类是避免结冰型（Freeze avoidance)，这类昆虫通过调节自身代谢作用能降低自身的过冷却点，从而避免体液结冰而保护细胞膜。如去除冰核剂（Ice nucleators）以减少体液或细胞液的冻结成冰作用；合成抗冻蛋白（Antifreeze proteins）减少结晶的成核作用；积累糖醇类（Sugars and polyols）等抗冻小分子物质以降低结晶温度（Zachariassen，1985；Ramlov，2000；Duman，2001；Holmstrup *et al.*，2002)。第 2 类是耐结冰型（Freeze tolerance)，此类昆虫一般有较高的零下结晶温度，能够抵抗结冰。通常促进细胞外液在较高的亚致死温度下结冰，从而阻止细胞内液的进一步结冰，避免其造成的更大损伤（Ramlov，2000)。第 3 是防冷冻脱水（Cryoprotective dehydration)，此类昆虫的体表渗透能力较强，当外界环境温度降低时昆虫体内发生脱水，体内含水量下降；体内糖原减少而海藻糖增加；同时昆虫的过冷却点也下降。因此此类昆虫在变化的环境温度下，调节自身的水分含量来维持体内水分与外界结冰的平衡状态，从而减少低温的危害（Coulson *et al.*，1995；Holmstrup and Somme，1998)。根据不同的特征或标准，昆虫的抗冻耐寒性有其他划分类型，如根据昆虫死亡出现的时间将耐寒性划分为 5 类（Bale，1996)：1. 耐结冰型（Freeze-tolerance)；2. 避免结冰型（Freeze-avoidance)；3. 耐受寒冷型（Chill-tolerance)；4. 寒冷敏感型（Chill susceptible)；5. 机会主义型（Opportunistic survival)。

昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析是昆虫低温生物学的重要研究内容。本文从昆虫生态，及生理生化层面介绍昆虫抗冻耐寒能力的测定与

分析方法。一方面，以昆虫种群为对象，分析低温对种群存活的胁迫作用，如低温实验中种群的存活率，致死中温度或致死中时间，冷伤害上限温度，冷害低温总和，以及低温冷伤害的死亡速率等。另一方面，以昆虫个体为对象，测定个体为适应低温环境而采取响应机制，如昆虫个体过冷却点、含水量、能量物质、抗冻小分子物质和抗冻蛋白含量等。

2 低温对种群存活的胁迫作用

低温存活率实验，不仅能够定量明确低温对昆虫种群的危害作用，而且同时可以反映种群在低温胁迫下的抗冻耐寒能力。

2.1 致死中温度或致死中时间

类似于分析化学农药对昆虫的杀伤作用中常用的半致死量（LD_{50}）一样，可以利用致死中温度或致死中时间来定量分析低温对昆虫的伤害作用，即在特定的时间下导致 50%的个体死亡的温度（LT_{50}），或在特定的温度下能导致 50%的个体死亡的时间（Lt_{50}）来表示。

设置一系列的温度和时间梯度组合，测试出不同组合下昆虫种群的死亡率，再绘制出死亡率与时间，死亡率与温度的散点图。利用数学模型方法如逻辑斯蒂（Logistic）回归方程（方程式 1）拟合出死亡率（S）与时间（t），死亡率（S）与温度（T）的关系变化曲线即随着时间的延长和温度降低，其死亡率升高。最后通过拟合的数学方程确定致死中温度（LT_{50}）或致死中时间（Lt_{50}）。这样对不耐结冰的昆虫来说，在特定温度下的致死中时间，和在特定时间下的致死中温度就可以描述一个昆虫个体的抗冻耐寒能力的强弱，以及进行不同种或不同地理种群之间的抗冻耐寒性比较。拟合方程如下：

$$S(x)=\frac{e^{a-b\cdot x}}{1+e^{a-b\cdot x}} \qquad \text{（方程式 1）}$$

方程式 1 中，其中 x 可以表示时间 t 或温度 T；S（x）为昆虫种群在一定时间或低温下的死亡率（%）。当死亡率 $S(x)$ 为 50%时，即 $a–b\cdot x=0$，$x=a/b$。根据低温存活实验数据，利用数学模拟方法求出 a 和 b 值。最后得出 x 值即致死中温度（LT_{50}）或致死中时间（Lt_{50}）。

2.2 冷伤害上限温度和冷害低温总和

冷伤害上限温度（The upper limit of chill injury zone，ULCIZ）和冷害低温总和（Sum of injufious temperature，SIT）两个参数可以用来分析昆虫的抗冻耐寒能力（Nedved，2000）。冷伤害上限温度是在持续的低温暴露中开始造成死亡的那一温度，只有当温度低于此温度点时，才可能引起有效的冷伤害（Nedved，2000）。冷害低温总和是导致有效冷伤害的时间和有效冷害低温共同作用的综合表达，即在一定时间内所获低温胁迫的累计量（Nedved，2000）。

自然界中季节性低温与时间协同影响昆虫种群的存活率。在低温存活率的实验中，时间和温度也存在着交互作用。因此可以利用双变量逻辑斯蒂（Logistic）回归方程拟合存活率与时间 - 温度的关系（Nedved *et al.*，1998）。方程式 2 如下：

$$S(t,T)=\frac{e^{a+b\cdot t\cdot(T-c)}}{1+e^{a+b\cdot t\cdot(T-c)}} \qquad \text{（方程式 2）}$$

方程式 2 中，3 个变量其中 t 表示时间，T 为温度；S（t，T）为昆虫种群在时间 t 和温度 T 条件下的死亡率（%）。a，b，c 为参数。利用双变量逻辑斯蒂（Logistic）回归方程（方程式 2）拟合实验数据求出参数 a，b，c。因此在 3 个变量（S，t，T）中，明确了 2 个变量可以得出第 3 个变量。当明确昆虫种群存活率 S 和低温 T，根据方程式 3 可以得出时间 t；当明确昆虫种群存活率 S 和时间 t，根据方程式 4 可以得出低温 T；

$$t=\frac{\ln\left(\frac{S}{1-S}\right)-a}{b\cdot(T-c)} \qquad \text{（方程式 3）}$$

$$T=c+\frac{\ln\left(\frac{S}{1-S}\right)-a}{b\cdot t} \qquad \text{（方程式 4）}$$

为了简化，一般设定在低温条件下种群死亡率 S=50%，方程式 3 和 4 分别简化为方程式 5 和方程式 6。

$$t = -\frac{a}{b}\cdot\frac{1}{T-c} \qquad \text{（方程式 5）}$$

$$T = c - \frac{a}{b}\cdot\frac{1}{t} \qquad \text{（方程式 6）}$$

a/b 值则是描述冷伤害中时间和温度关系的重要常数，它的值等于种群死亡率 S（t， T）为 50% 时的有效冷害低温累积量，即 SIT（相当于半致死冷害积温），单位为日·度（degree·day）；而 c 的值则代表 ULCIZ 冷伤害上限温度，单位是℃。

2.3　低温冷伤害的死亡速率

昆虫的发育速率是重要的生物学参数。方程式 7 可用来表示昆虫的发育和温度的关系（Nedved，2000）：

$$r = \frac{1}{t} \qquad \text{（方程式 7）}$$

方程式 7 中，r 为发育速率，t 为发育时间。

同样可以根据昆虫的发育起点温度（Lower developmental threshold，LDT）和发育有效积温（Sum of effective temperature，SET）得出发育速率 r：

$$r = \frac{T - LDT}{SET} \qquad \text{（方程式 8）}$$

相对于发育速率，昆虫在低温条件下半致死中时间的死亡速率 r'：

$$r' = \frac{1}{LD_{50}} \qquad \text{（方程式 9）}$$

基于的冷伤害上限温度（The upper limit of chill injury zone，ULCIZ）和冷害低温总和（Sum of injufious temperature, SIT）2 个参数的概念，将方程式 8 应用到分析低温冷伤害中昆虫的死亡速率 r'：

$$r' = \frac{ULCIZ - T}{SIT} \qquad \text{（方程式 10）}$$

因此，利用昆虫在低温条件下的种群死亡速率大小可以用来分析不同昆虫种群的抗冻耐寒能力。

3　个体为适应低温的响应机制

昆虫抗冻耐寒能力是生物体对栖息环境适应过程中体内生理、生化等方面协调的结果。测定和分析昆虫个体的抗冻耐寒能力包括以下方面。

3.1　过冷却点

在许多昆虫中，过冷却点被看作是耐寒性的一个重要指标，昆虫的过冷却点是指随体液温度逐步的降低，昆虫体内自发的冰核出现，且冰晶开始增长的那一温度。过冷却能力是指液体的熔点与过冷却点之间的差异。通常用过冷却点来表示，当自发结冰时通过潜热的释放，能够准确地测定昆虫的过冷却点。昆虫中多数死亡发生的过程都处在体液溶点以下的过冷却状态，因此测定过冷却点是研究昆虫抗冻耐寒性的一个必要内容，它有助于全面地理解昆虫的抗冻耐寒性。

测定方法：每实验处理组取若干头昆虫个体用于过冷却点的测定。将昆虫个体固定在热敏电阻探头上，另一端与多路昆虫过冷却点测试系统相连。将固定昆虫个体的探头放入低温冰箱中，并保证降温速率约 1 ℃/min，一般设定冰箱最低温度为 - 30℃。昆虫过冷却点测试系统通过计算机软件开始记录虫体表温度的变化。开始虫体的温度持续下降，直到虫体开始结冰，虫体释放潜热，温度陡然上升，释放潜能的起点处记录的温度即为过冷却点；虫体温度继续回升，直到再次下降，这个转折点记录的温度即为冰点（Freezing point）。

3.2　含水量和能量储备物质

昆虫在度过低温或越冬过程中，一般不取食。虽然昆虫在此过程中的特征是发育极其缓慢，代谢强度低，但是越冬时间漫长，需要消耗一定的能量物质来维持生理生化代谢，同时需要自身体内化学反应产生热量来抵触外界的低温环境。因此昆虫一般在越冬之前积累大量的能量物质。糖原和脂肪是两种重要能量储备物质（Adedokun and Denlinger，1985）。

3.2.1　体重和含水量的测定　耐寒昆虫在寒冷适应过程中，体内含水量大大下降，许多昆虫在越冬时体内含水量几乎下降到致死临界点。水分的排除增加了体内溶质的浓度，降低了体

液的冰点和过冷却点。此外，由于含水量的降低，体内连续较大的整体水相可能被一些组织或某些高浓度的物质所分离，而有利于昆虫体液的过冷却。

取各实验处理组昆虫个体若干头，用电子天平（精度 0.01 mg）鲜重（WW），然后将个体放 60℃的烤箱中 72 h，干重（DW）。含水量根据鲜重和干重比例计算而得。

3.2.2 脂肪含量的测定

（1）试剂准备：氯仿和甲醇的混合液：（氯仿：甲醇=2：1），100 mL：50 mL

（2）步骤具体见表 1。

3.2.3 糖原含量的测定

（1）试剂准备：

乙醇（70%）：70 mL 乙醇定容到 100 mL 容量瓶；

三氯乙酸溶液 10%（v/v）：10 mL 三氯乙酸+90 mL 蒸馏水，100 mL 容量瓶；

苯酚（5%）：2.5 mL 苯酚定容到 50 mL 容量瓶；

（2）步骤具体见表 2

表 1 脂肪的测定步骤

Table 1 Operation process of fat

步骤 Step	具体操作 Operation process
个体称重 Weighing individual	取测完昆虫个体含水量的干重（DW），加入 2 mL 氯仿和甲醇的混合液（氯仿：甲醇=2：1），研磨匀浆
匀浆 Homogenate	离心 10 min（2 600 g），移去上层清液。残渣再加入 2 mL 氯仿和甲醇的混合液，重复离心一次
剩余物 Residua	在 60℃的烤箱中烘烤 72 h 至恒重（LDW）
脂肪重 Fat weight	DW-LDW
脂肪含量 Fat content	[(DW-LDW)/DW]×100

表 2 糖原的测定步骤

Table 2 Operation process of glycogen

步骤 Step 类型	具体操作 Operation process
个体称重 Weighing individual	称重
	加入 2 mL 的 70%乙醇，研磨匀浆
匀浆 Homogenate	离心 10 min（2 600 g），除去上层清液，重复离心一次
剩余物 Residua	加入 2 mL 10%（v/v）的三氯乙酸，此混合液在沸水中煮沸 15 min，冷却后离心 15 min（3 000 g）。上层清液用于糖原测定
糖原测定 Measuring glycogen	酚-硫酸方法（Dubois *et al.*，1956）
	样本 0.5 mL
	苯酚（5%）0.5 mL
	浓硫酸 H_2SO_4 2.5 mL
	静止 10 min-摇匀-加热 20 min-冷却
	加入蒸馏水 3 mL，稀释至 14 mL
反应物测定 Measuring reactant	吸收峰在 DU650 紫外分光光度计 490 nm 处测定

3.3 抗冻耐寒性物质

昆虫抗寒性物质包括两类：抗冻小分子糖醇物质和抗冻蛋白。

3.3.1 抗冻小分子糖醇物质 目前已知的抗冻小分子抗寒性物质有甘油、山梨醇、甘露醇、五碳多元醇（可能是阿拉伯糖醇或核糖醇）、海藻糖、葡萄糖、果糖，以及个体昆虫体内的氨基酸和脂肪酸类物质（Salt，1961；Kostal and Simek，1995）。不同昆虫所积累的物质种类和含量是不同的，但大多昆虫都用几种物质构成一个物质系统。

采用硅烷化衍生物改进的气象色谱测定方法分析个体体液中抗冻低分子物质的含量，步骤见表 3。

3.3.2 抗冻蛋白 抗冻蛋白（Antifreeze protein）是一些植物、寒带鱼类和在极地或温带生活的昆虫及蜘蛛等在秋、冬季体内产生的一类能提高其抗冻能力的多肽。产生抗冻蛋白是许多昆虫的一个重要的越冬抗冻策略。一般认为抗冻蛋白在脂肪体中合成，然后释放到血淋巴中通过氢键与冰晶连接阻止冰晶的进一步增长，从而降低体液的结冰点，增大熔点与冰点之间的差异，这现象被称为热滞现象。这些蛋白称为抗冻蛋白，由它所导致的冰点与熔点之差称为热滞温度或热滞活性（Thermal hysteresis activity）。

近年来，越来越多的越冬昆虫被认为以产生抗冻蛋白作为其对低温适应的策略，不仅在昆虫的体液，而且在昆虫的肠液和细胞内液中都有抗冻蛋白的产生，昆虫体内的热滞蛋白不是作为溶质来降低体液的结冰点，也不改变体液的渗透压，这样就避免了渗透压增长所带来的潜在的破坏作用。而低温下昆虫体内产生的多元醇则会因提高了体液的渗透压而造成组织受损，这也是抗冻蛋白作为一种越冬适应策略优于多元醇的地方。

测定方法：首先对生物个体进行研磨，透析，离心等进行抗冻蛋白的提取，然后双向电泳纯化，氨基酸末端序列分析，氨基酸组份分析，蛋白质点杂交等对抗冻蛋白进行分析。

4 讨论

昆虫物种的多样性大，个体数量多以及基因多样化。因此昆虫类群在长期进化过程中为适应

表 3 抗冻小分子糖醇物质的测定步骤

Table 3 Operation process of low-molecular-weight sugars and sugar- alcohols

步骤 Step	具体操作 Operation process
取样 Sampling	从每个个体取 10 μL 血淋巴加入到含有 0.4 mL79%（v/v）乙醇（含 10 μg 赤鲜糖做内标）的离心管中匀浆：0.4 mL 79%（v/v）乙醇（含 10 μg 赤鲜糖做内标）1 配置 79%（v/v）乙醇 500 mL：395 mL 乙醇+105 mL 蒸馏水；2.250 mL 定容 79%（v/v）乙醇，6.25 mg 赤鲜糖
离心 Centrifugation	离心 5 min（10 000 g），上层清液移出，重复离心一次。上层清液置于 - 20℃的冰箱
吹干 Drying	分析前，样液在 40℃的条件下用氮气吹干
水浴 Water bath	在剩余物中分别加入 25 μL 二甲基酰胺和含羟胺的吡啶溶液，在 70℃的水浴中加热 15 min
反应 Reaction	在反应混和物中加入 75 μL 的二甲基酰胺和 30 μL 的三甲基硅烷基咪唑，在 80℃的水浴中加热 15 min 完成硅烷化反应

* 资助项目：“国家重点基础研究发展计划资助（973 计划）”项目（编号 2013CB127604）；国家自然科学基金委项目（31200321）和国家科技支撑计划（编号 2012BAD19B05）

**通讯作者，E-mail: gef@ioz.ac.cn

收稿日期：2014-09-20，接受日期：2014-10-13

萃取 Extraction	然后用异辛烷萃取衍生物
分析 Analysis	用微量注射器取 1 μL 萃取液注入气相色谱仪（Agilent 7890 GC）进行定量分析。气相色谱所用载气为氮气，检测器为氢离子焰，检测器温度为 300℃；进样室温度为 280℃；温度程序为 120℃停留 1 min，上升速率为 10 ℃/min 到 280℃停留 30 min

多样化的生境条件而从行为、生理生化、以及基因表达等各个层面形成了应对低温环境的各种抗冻策略或耐寒机制。本文仅仅从昆虫生态，及生理生化层面介绍昆虫抗冻策略和耐寒机制以及昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法。在未来，从微观上看随着低温生物学拓展到基因组、转录组、蛋白质组及代谢组层次的研究，从宏观上看随着越冬代昆虫种群数量动态及其迁飞转移行为规律与栖息地微环境气候和区域性景观格局特征等的关系研究，有利于更全面地和深入地了解昆虫类群的抗冻策略或耐寒机制，从而为更系统地建立昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法体系提供可靠指标。

参考文献 (References)

Adedokun TA, Denlinger DL, 1984. Cold-Hardiness - a component of the diapause syndrome in pupae of the flesh flies, *Sarcophaga crassipalpis* and *Sarcophaga uullata*. *Physiological Entomology*, 9(4): 361–64.

Bale JS, 1996. Insect cold hardiness: A matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93(3): 369–382.

Coulson SJ, Hodkinson ID, Strathdee AT, Block W, Webb NR., Bale JS, Worland MR, 1995. Thermal environments of Arctic soil organisms during winter. *Arctic and Alpine Research*, 27(4): 364–370.

Duman JG, 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*, 63(1): 327–357.

Holmstrup M, Bayley M, Ramlov H, 2002. Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8): 5716–5720.

Holmstrup M, Somme L, 1998. Dehydration and cold hardiness in the Arctic Collembolan *Onychiurus arcticus* Tullberg 1876. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 168(3): 197–203.

Kostal V, Simek P, 1995. Dynamics of cold-hardiness, supercooling and cryoprotectants in diapausing and nondiapausing pupae of the cabbage root Fly, *Delia radicum* L. *Journal of Insect Physiology*, 41(7): 627–634.

Nedved O, 2000. Chill tolerance in the tropical beetle Stenotarsus rotundus. *Cryo-Letters*, 21(1): 25–30.

Nedved O, Lavy D, Verhoef HA, 1998. Modelling the time- temperature relationship in cold injury and effect of high-temperature interruptions on survival in a chill-sensitive collembolan. *Functional Ecology*, 12(5): 816–824.

Payne NM, 1926. Freezing and survival of insects at low temperatures. *Quarterly Review of Biology*, 1(2): 270–282.

Ramlov H, 2000. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction*, 15(5): 26–46.

Resh VH, Cardé RT, 2009. Encyclopedia of Insects, Elsevier Science. Academic Press is an imprint of Elsevier. Oxford, UK. 623–626.

Salt RW, 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6(1): 55–74.

Sinclair BJ, Vernon P, Klok CJ, Chown SL, 2003. Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5): 257–262.

Somme L, 1996. The effect of prolonged exposures at low temperatures in insects. *Cryo-Letters*, 17(6): 341–346.

Storey KB,, Storey JM, 2012. Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 90(4): 456–475.

Zachariassen KE, 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews*, 65(4): 799–832.