

昆虫冷驯化机制研究进展*

孔 璐 郭建英** 周忠实 万方浩

(中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要 昆虫耐寒性强弱决定其种群的发生、扩散和分布,因此低温胁迫下昆虫的抗寒对策成为近期研究的热点领域。冷驯化作为一种非常有效的耐寒策略,可显著增强昆虫的耐寒性。本文论述了冷驯化的 2 种基本形式:快速冷驯化和长时冷驯化,明确了二者在提升昆虫耐寒性中的作用;并从宏观到微观的角度概述了冷驯化的作用机制,如组织和细胞水平的特异性,低分子量抗冻保护剂的产生,热休克蛋白的表达及功能,以及阻止细胞程序性死亡的潜在机理等;讨论了不同研究方法所引起的结果差异性,并强调了冷驯化作用机制的整体效益和综合效益。最后通过分析 2 种冷驯化形式的联系与区别,以期较为全面地阐明昆虫冷驯化的潜在机制。

关键词 快速冷驯化, 长时冷驯化, 抗冻保护剂, 冷休克, 热休克蛋白

Progress in research on cold hardening in insects

KONG Lu GUO Jian-Ying** ZHOU Zhong-Shi WAN Fang-Hao

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Cold hardiness is crucial for the establishment, dispersion and distribution of insect populations. Consequently, the cold tolerance strategies of insects have become a popular research topic. Cold hardening, as an effective cold tolerance strategy, can remarkably improve the chill tolerance of insects. This paper introduces two basic forms of cold hardening; rapid cold hardening and cold acclimation, and their respective roles in insect cold shock resistance. Cold hardening mechanisms are summarized from both macroscopic and microcosmic perspectives, including their specificity at the tissue and cell levels, the increased level of low-molecular weight cryoprotectants, the expression and function of specific protective proteins such as heat shock proteins and the underlying mechanism of blocking cold-induced apoptosis etc. Differences in reported results due to different research methods are discussed and the comprehensive and integrated effects of the two types of cold hardening are emphasized. In addition, correlations and differences between the two types of cold hardening are analyzed in order to better reveal intrinsic mechanisms of cold hardening in insects.

Key words rapid cold hardening, cold acclimation, cryoprotectants, cold shock, heat shock proteins

在地球上昆虫种类繁多,分布于世界各地各种气候条件如沙漠、草地、湖泊等,这些微生境小气候的变化促使昆虫进化出多种适应策略(Wang and Kang, 2005)。低温是影响昆虫生长发育的关键作用因子,严格制约着昆虫种群的延续,因此昆虫耐寒性的高低是其种群存活和扩散的重要前提(景晓红和康乐, 2002)。针对不同的低温栖境,昆虫会采取不同的抗寒策略。快速冷驯化(rapid

cold hardening, RCH)和长时冷驯化(cold acclimation, ACC)是增强昆虫耐寒性的 2 种主要驯化策略(Rajamohan and Sinclair, 2008)。但是二者的诱导条件具有显著区别,目前普遍认为 RCH 是由短期的日温波动所诱导,是对日温波动的适应性反应,ACC 则是由长期的季节温度波动所诱导,是对季节气温降低的适应性反应(Lee, 1989)。20 世纪 80 年代左右关于 RCH 反应能够

* 资助项目:国家自然科学基金(31170392)、国家 973 计划项目(2009CB119200)、国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAD08A18)。

**通讯作者, E-mail: guojy@mail.caas.net.cn

收稿日期:2011-05-30, 接受日期:2011-06-28

保护不耐结冰型昆虫如红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* Macquart 免于冷休克(一种低温刺激,所用温度为昆虫所能经受的极限低温)伤害的研究已有报道,如 Lee 等(1987)和 Chen 等(1987)的研究均表明,在冷休克前预先短期暴露于温和的亚致死低温条件下,能够显著提高红尾肉蝇的耐寒性。目前,冷驯化的研究已从最初的表现生物特性比较发展到现在的微观基因调控反应,在更深层次上揭示了冷驯化的生理生化机制。如, Qin 等(2005)采用微矩阵杂交和实时 RT-PCR 技术,对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 冷驯化处理后的基因表达丰富度和 mRNA 转录量分析表明,与 25℃ 常温饲养的对照相比,冷驯化(0℃ 暴露 2 h)后果蝇 37 段特殊 DNA 序列的表达丰富度产生显著变化,其中编码膜蛋白的 DNA 序列表达丰富度显著提高。由于近年来昆虫冷驯化的研究逐步向细胞分子水平发展,因此本文从宏观生理表现到微观细胞分子水平响应对冷驯化机制的研究进展进行综述,以期阐述冷驯化对于提升昆虫耐寒性的作用,为继续深入开展该领域的研究奠定基础并提供理论和实践参考。

1 快速冷驯化及其作用机制

1.1 快速冷驯化对昆虫存活的影响

RCH 能够提高昆虫耐寒性的现象已有较多报道。如,果蝇在冷暴露于 -5℃ 之前经 RCH(以 0.1℃/min 从 25℃ 降温至 0℃,并在 0℃ 保持 1 h)处理 72 h 后的死亡率为 37%,显著低于直接进行冷休克处理的 60%(Overgaard *et al.*, 2007);将东亚飞蝗 *Locusta migratoria* L. 低龄蝗蛹直接从 30℃ 转移到 -7℃,2 h 后存活率仅为 35.8%,若在转移到 -7℃ 之前先在 0℃ 驯化 2 h 则蝗蛹存活率显著提高至 75%(Wang and Kang, 2003);生活在南非卡鲁沙漠中的一种甲虫 *Afrinus* sp., 对日温的变化具有显著的 RCH 反应(Sinclair and Chown, 2006),因为沙漠昼夜温差极大的环境特殊性,导致生活在其中的昆虫必须建立适应机制,以应对日温的快速变化和低温的突然来袭。尽管 RCH 能提高昆虫的耐寒性,但并非所有昆虫都会采取这一抗寒对策,有些昆虫会针对特定生境采取行为的或 ACC 的作用机制。RCH 可能只是特定昆虫耐寒机制中的一种,通过与其他耐寒机制或者与环境条件相互作用而发挥效果,但目前对于这

些协同机制的研究尚缺乏整体性。为更全面地揭示冷驯化提高耐寒性的机制,我们应将昆虫的生理特性及其所处的特定环境结合起来进行研究,如 RCH 与昆虫取食或环境湿度条件的共同作用机制、RCH 与滞育对昆虫耐寒性的影响、昆虫特定生理周期(蜕皮、化蛹和羽化)对 RCH 的响应。研究表明,南极隐跳虫 *Cryptopygus antarcticus* (Willem) 在取食条件下耐寒性快速丧失,但部分个体在取食后耐寒性并未显著降低,可能与其所处蜕皮阶段有关(Worland *et al.*, 2007)。这一研究对于探讨 RCH 综合作用机制具有重要的启示意义。

1.2 快速冷驯化具有组织和发育阶段的特异性

由于冷休克所造成的冷伤害会引起细胞结构的破坏如细胞膜的相变和离子稳态失衡等,从而对昆虫组织乃至个体产生伤害(Kostal *et al.*, 2004),因而 RCH 的保护作用可能在组织细胞水平体现。例如 Yi 和 Lee(2004)对红尾肉蝇不同组织在体内和体外分别进行 RCH(于 0℃ 暴露 2 h 后于 -8℃ 暴露 2 h)和冷休克(于 -8℃ 暴露 2 h)处理后的细胞活性研究表明,与冷休克处理相比,RCH 显著提高了脂肪体、中肠、马氏管和唾液腺这 4 种组织的细胞存活率;经 RCH 处理,果蝇体内的脂肪体和中肠细胞活性(分别为 77.0% 和 73.2%)显著高于马氏管和唾液腺的活性(分别为 50.6% 和 52.2%);且除了脂肪体外 RCH 对于体内和体外组织的作用无显著差异,这项研究首次揭示了昆虫细胞的 RCH 作用可不受中枢神经系统和神经分泌激素调控而仅在组织水平进行响应。Yi 和 Lee(2011)的深入研究表明,RCH 通过抑制红尾肉蝇半胱氨酸酶前体的活化来避免冷休克诱导的细胞程序性死亡,从而降低组织细胞的死亡率,但是从 DNA 凝胶电泳条带上显示 RCH 和直接冷休克处理后的中肠细胞 DNA 片段没有显著差异而脂肪体细胞具有显著差异,说明 RCH 对中肠的保护作用并不是很明显,其反应具有组织特异性。此外,昆虫的发育阶段对于其快速冷驯化能力也有一定程度的影响。如,果蝇幼虫、蛹和成虫具有 RCH 反应能力,其卵、幼虫末期和蛹前期则不具备 RCH 能力,幼虫末期经 RCH 处理存活率反而降低(Jensen *et al.*, 2007)。Wang 和 Kang(2005)发现东亚飞蝗的卵不同发育阶段具有

不同的 RCH 的反应能力,在以 0.05℃/min 从 30℃ 降温至 -10℃ 的 RCH 条件下经冷休克 (-10℃ 暴露 10 h) 处理后发育中期和后期阶段的卵比早期的卵存活率更高。可见, RCH 反应具有发育阶段的特异性。

1.3 快速冷驯化对细胞膜的作用

在细胞水平上,冷休克能够对昆虫造成冷伤害如破坏蛋白质结构和功能、损伤细胞膜并引起膜内外离子失衡等 (Kostal *et al.*, 2004)。冷休克通过对细胞膜的作用引起昆虫体内一系列的连锁反应,导致体内代谢紊乱,从而扰乱昆虫的正常生理最终致死昆虫。近年来有关 RCH 对细胞膜保护机制的研究已从细胞膜流动性 (Leejr *et al.*, 2006)、膜脂饱和度 (Overgaard *et al.*, 2005)、磷脂头基成分变化 (Michaud and Denlinger, 2006)、膜内离子泵 (Kostal *et al.*, 2007) 等方面开展。

细胞膜的流动性对于昆虫保持自身代谢平衡具有重要意义,低温对昆虫正常生理代谢的干扰作用是从细胞水平开始的,其中,细胞膜流动性是衡量昆虫冷伤害程度的一个重要指标 (Leejr *et al.*, 2006)。研究表明, RCH 可显著提高昆虫脂肪体细胞的存活率和细胞膜流动性,如,棕尾别麻蝇 *Sarcophaga bullata* Parker 在冷休克 (-8℃ 暴露 2 h) 处理中脂肪体细胞存活率仅为 21.3%,经 RCH (0℃ 暴露 2 h) 后提高至 68.5%,³¹P 固态核磁共振光谱分析表明, RCH 处理后其脂肪体细胞膜的流动性显著提高 (Leejr *et al.*, 2006)。

快速冷驯化可提高细胞膜膜脂的不饱和度,从而维持细胞膜的完整性和流动性,保护细胞膜的液晶相,保障细胞膜正常的生理功能 (Overgaard *et al.*, 2005; Michaud and Denlinger, 2006)。如,红尾肉蝇经 RCH (4℃ 暴露 8 h) 处理,细胞膜的油酸含量占膜脂含量的比例从 30% 上升至 47% (Michaud and Denlinger, 2006)。果蝇经 RCH (以 0.1℃/min 从 25℃ 降温至 0℃,并在 0℃ 保持 1 h) 处理 5 h 后,其细胞膜磷脂成分发生显著变化,多元不饱和亚油酸含量升高,一元不饱和磷脂和饱和磷脂的丰富度降低,总体上磷脂的不饱和度升高 (Overgaard *et al.*, 2005)。但针对同一种昆虫采用不同的 RCH 处理,其对细胞膜的效应可能不同。如,果蝇在 0℃ 暴露 2 h 的 RCH 处理未引起细胞膜磷脂饱和度的显著变化,膜脂链长度和脑

磷脂/卵磷脂比例也无显著差异 (MacMillan *et al.*, 2009),其与 Overgaard 等 (2005) 结果的差异为深层次探究 RCH 条件和机制提供了新的研究思路。

昆虫耐寒性的增强离不开机体内稳态的平衡,在低温条件下调整细胞膜内外离子浓度也是昆虫的耐寒性机制之一。如,无翅红蜡 *Pyrhocoris apterus* L. 在波动低温期 (-5℃ 下暴露 22 h 后在 20℃ 暴露 2 h) 和持续低温期 (-5℃) 其体内 K⁺ 浓度均较高,在持续高温期 (20℃ 下 2 h) 其体内 K⁺ 则保持正常水平,因此,细胞膜中离子泵系统对于膜内外离子梯度的调节可能在昆虫耐寒性方面具有积极作用 (Kostal *et al.*, 2007)。

1.4 快速冷驯化诱导抗冻保护剂含量的变化

昆虫在逆境胁迫 (干旱、缺氧、热冷休克等) 情况下,受代谢的调控其体内生化物质发生一系列变化。在冷休克条件下昆虫体内一些与耐寒性相关的低分子量物质如糖类、多元醇和游离氨基酸的含量会发生显著变化,这些物质在昆虫发育和季节冷适应中具有重要作用。因而通过研究昆虫在 RCH 过程中体内抗冻保护剂的变化,可以揭示昆虫对 RCH 的代谢响应。MacMillan 等 (2009) 研究表明,在细胞膜膜脂成分未产生显著变化的情况下, RCH 也能显著提高果蝇在冷休克中的存活率,推测可能是 RCH 诱导的抗冻保护剂通过稳定细胞膜和蛋白质的功能而起的作用。目前,关于昆虫在 RCH 作用下抗冻保护剂代谢的研究主要集中于甘油、海藻糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和丙酮酸等 (Wang and Kang, 2005; Michaud and Denlinger, 2006; Overgaard *et al.*, 2007)。如,经 RCH 处理后,红尾肉蝇体内甘油、葡萄糖和山梨醇含量显著上升,其中甘油含量提高 2~3 倍,海藻糖和甘露醇含量则显著下降 (Chen *et al.*, 1987; Michaud and Denlinger, 2007)。甘油是昆虫体内一种重要的抗冻保护剂,可保护细胞膜和蛋白质并提高昆虫体液的过冷却能力 (Lee, 1991)。但也有研究发现,经 RCH 诱导后果蝇体内甘油或其他潜在抗冻保护剂含量并未增长 (Kelty and Lee, 1999, 2001)。Overgaard 等 (2007) 研究则表明, RCH 引起果蝇体内葡萄糖和海藻糖含量升高,并与其耐寒性的增强紧密相关,但 RCH 未引起甘油含量显著上升。这些研究结果的差异可能是由不同的昆虫种类或不同的 RCH 处理方式导致 RCH

诱导产生的代谢途径各异造成的。

1.5 快速冷驯化诱导热休克蛋白的表达

昆虫在多种环境胁迫(如极端温度)下均会产生热休克蛋白(heat-shock protein, HSP),对于提高体内新合成多肽链的正确折叠以及防止降解的蛋白重新聚集发挥重要作用,其参与昆虫的多种生理代谢过程,最受关注和公认的功能就是提高耐热性和保护机体免受极端温度的伤害(Burton *et al.*, 1988; Gehring and Wehner, 1995)。如,果蝇长期暴露于 0℃ 下,体内会诱导产生热休克蛋白(Burton *et al.*, 1988)。冷休克处理能诱导美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 体内热休克蛋白基因 *hsp90*、*hsp70*、*hsp40* 和一些小分子 *hsps* 的表达(Huang and Kang, 2007)。Huang 等(2009)还发现,在冷驯化期间美洲斑潜蝇体内小分子热休克蛋白基因 *hsp19.5*、*hsp20.8* 和 *hsp21.7* 被显著诱导产生热休克蛋白,其中以 *hsp20.8* 对冷驯化最为敏感,且不同强度冷胁迫条件下其表达的热休克蛋白种类和含量不同。环境胁迫条件(如热休克、结冰和冷休克等)能诱导昆虫细胞的程序性死亡,RCH 则能显著降低由冷休克诱导的细胞程序性死亡的频率。如,Yi 等(2007)通过蛋白质杂交技术验证了热休克蛋白 Hsp70 和 Hsp27 参与果蝇的 RCH 反应,二者具有防止果蝇细胞程序性死亡、保护细胞和加强机体耐寒性的作用。热休克蛋白在快速冷驯化中所起的作用尚有很多不甚明了的地方,随着现代基因组学和蛋白质组学的快速发展,今后有望从快速冷驯化中热休克基因表达调控的角度来探究 RCH 的整个驯化过程。

2 长时冷驯化作用机制

作为对长时间季节变化的反应,ACC 也可提高昆虫的耐寒性。与 RCH 不同的是,ACC 过程中昆虫所经历的驯化温度较高,处理温度相对温和;驯化的时间也较长,RCH 对昆虫的驯化在几小时甚至几分钟内即起作用,但 ACC 的驯化时间则长达数天乃至数个星期。因此 2 种驯化的作用机理必然存在差异。

Shintani 和 Ishikawa (2007)对黄星天牛 *Psacothaea hilaris* (Pascoe) 卵的耐寒性研究表明,经 ACC (15.5℃ 保持 9 d) 处理再暴露于 0 ~ -22℃ 的低温时,卵存活率显著高于未经 ACC 处理的对照

(25℃ 保持 5 d 后进行低温暴露);在冷胁迫(-10℃ 暴露 8 h 以上)条件下经 ACC 处理的卵的存活率显著高于经 RCH (0℃ 暴露 4 h) 处理的卵;相反,在卵的过冷却点 -26℃ 左右,ACC 处理和对照的存活率均很低,RCH 处理的存活率则较高。这些结果表明,ACC 能在一定程度上提高昆虫的耐寒性,但其产生作用的温度和时间范围有限,与 RCH 相比其在过冷却点附近的作用很弱但是在温和低温下的作用时间则相对较长。此外,ACC 在急剧降温时对昆虫耐寒性的提高没有作用。如,在突然降温(直接置于 -10℃)和快速降温(以 -0.8℃/min 从 30℃ 降至 -10℃) 2 种处理下,经 ACC (5℃ 保持 3 d) 处理和未经 ACC 处理的东亚飞蝗卵的存活率没有显著差异(Wang and Kang, 2005)。

ACC 在昆虫细胞水平上的作用也有报道。如,在冷胁迫条件下对影响葱蝇 *Delia antiqua* (Meigen) 细胞膜恒黏适应性的 $\Delta 9$ -酰基-CoA 脱氢酶表达量的研究表明,经 ACC (5℃ 处理 0、2、8 和 32 d) 处理的非滞育蛹的大脑、中肠和马氏管中 mRNA 的表达量都显著提高了 2 ~ 10 倍,且随着驯化时间的延长蛹在 -20℃ 下暴露 5 d 后的存活率也相对提高,反之,经 ACC 处理 32 d 后脂肪体中的 mRNA 表达量较初期降低了一半且细胞的存活率持续下降(Kayukawa *et al.*, 2007)。可见,ACC 对昆虫耐寒性的增强作用具有一定的组织特异性。

3 快速冷驯化和长时冷驯化相互作用对昆虫耐寒性的影响

在自然条件下,生活在寒带和温带的昆虫都要经历漫长而寒冷的冬季,且同时要承受日温大幅波动的环境压力。在此条件下,昆虫在长期进化过程中形成了相应的适应性特征,即耐受长期低温的长时冷驯化和耐受短期低温的快速冷驯化,二者作用互补以保证昆虫顺利度过不良的低温胁迫逆境(Li *et al.*, 2001; 景晓红和康乐,2002; Shintani and Ishikawa, 2007)。由于 ACC 和 RCH 这 2 种驯化机制会因昆虫种类和发育阶段不同而呈现各自的特异性,二者的作用效果也有差异。如,Chen 等(1990),Larsen 和 Lee (1994) 研究均表明,与 RCH 相比,ACC 能更好地保护红尾肉蝇和帝王蝶 *Danaus plexippus* L. 免受冷休克的伤害。近

年来,随着科学家们对昆虫快速冷驯化研究的深入,关于 ACC 与 RCH 综合效应的研究也已开展。如,Shintani 和 Ishikawa (2007) 报道,经 RCH 和 ACC 联合处理能更有效地提升黄星天牛卵的耐寒性,其在 -16°C 冷休克条件下的半数致死时间 (LT_{50}) 比单独用 ACC 或 RCH 处理的分别延长 1.6 d 和 3.6 d;但在某些特定温度条件下,ACC 和 RCH 联合处理效果只相当于其中一种的效果,如在 -10°C 左右 ACC 和 RCH 联合处理效果仅与 ACC 相同,在过冷却点 -26°C 左右 ACC 和 RCH 联合处理效果仅与 RCH 相同。因此,今后的研究可以通过探究昆虫 RCH 和 ACC 协同作用的最适温度和时间范围,为昆虫人工大量饲养和低温存储条件的优化提供技术依据。

4 研究展望

早期对昆虫冷驯化的研究大多是一些表现现象的研究报道,近年来随着各种分子研究手段的突飞猛进,冷驯化作用机理的研究日益深入,逐渐从宏观的表象研究发展到微观的探索。关于 RCH 的研究,已发展到综合昆虫的发育阶段、所处环境及行为方式进行探究;与 RCH 作用相关的蛋白也已相继被发现。如,红尾肉蝇在 0°C 暴露 10 min 后其体内分裂素活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 含量显著上升,并与 RCH 生理响应指标显著相关,表明此酶在 RCH 诱导红尾肉蝇耐寒性过程中具有重要作用 (Fujiwara and Denlinger, 2007)。南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) 和美洲斑潜蝇受低温胁迫时热休克蛋白基因 *hsp90*、*hsp70*、*hsp60*、*hsp40* 和 *hsp20* 的表达谱已通过实时荧光 PCR 和蛋白免疫印迹 (western blotting) 获得 (Huang and Kang, 2007)。这些蛋白的表达和提纯对我们今后进一步探讨昆虫的冷驯化机制提供了理论和实践依据。昆虫冷驯化的机制是复杂而多方位的,针对昆虫冷驯化的研究不应脱离各种内在和外因因素进行。将冷驯化和生活史的某个方面 (如发育阶段、季节变更、代谢和行为等) 联系起来进行研究,逐一明确各种因素与冷驯化的相互影响,进而综合考虑多种内因和外因进行整体探究,这样才能深入解析昆虫的冷驯化机制。

参考文献 (References)

- Burton V, Mitchell HK, Young P, Petersen NS, 1988. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.*, 8 (8) :3550—3552.
- Chen CP, Denlinger DL, Lee RE, 1987. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Zool.*, 60 (3) :297—304.
- Chen CP, Lee RE, Denlinger DL, 1990. A comparison of the responses of tropical and temperate flies (Diptera: Sarcophagidae) to cold and heat stress. *J. Comp. Physiol.*, 160 (5) :543—547.
- Fujiwara Y, Denlinger DL, 2007. p38 MAPK is a likely component of the signal transduction pathway triggering rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Exp. Biol.*, 210 (18) :3295—3300.
- Gehring WJ, Wehner R, 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *PNAS*, 92 (7) :2994—2998.
- Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol.*, 16 (4) :491—500.
- Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativae*. *J. Insect Physiol.*, 55 (3) :279—285.
- Jensen D, Overgaard J, Sorensen J, 2007. The influence of developmental stage on cold shock resistance and ability to cold-harden in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 53 (2) :179—186.
- Kayukawa T, Chen B, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 2007. Upregulation of a desaturase is associated with the enhancement of cold hardiness in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37 (11) :1160—1167.
- Kelty JD, Lee RE, 1999. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 45 (8) :719—726.
- Kelty JD, Lee RE, 2001. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J. Exp. Biol.*, 204 :1659—1666.
- Kostal V, Renault D, Mehrabianova A, Bastl J, 2007. Insect cold tolerance and repair of chill-injury at fluctuating thermal regimes: role of ion homeostasis. *Com. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 147 (1) :231—238.
- Kostal V, Vambera J, Bastl J, 2004. On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis

- and energy charge in the adults of *Pyrhocoris apterus*. *J. Exp. Biol.*, 207:1509—1521.
- Larsen KJ, Lee RE, 1994. Cold tolerance including rapid cold hardening and inoculative freezing of fall migrant monarch butterflies in Ohio. *J. Insect Physiol.*, 40 (10): 859—864.
- Lee RE, 1989. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 39 (5): 308—313.
- Lee RE, 1991. Principles of insect low temperature tolerance//Lee RE, Denlinger DL (eds.). *Insects at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York, Press. 17—47.
- Lee RE, Chen CP, Denlinger DL, 1987. A rapid cold-hardening process in insects. *Science*, 238 (4832): 1415—1417.
- Leej R, Damodaran K, Yi S, Lorigan G, 2006. Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology*, 52 (3): 459—463.
- Li YP, Gong H, Park HY, Goto M, 2001. Rapid cold hardening providing higher cold tolerance than cold acclimation in the pine needle gall midge *Thecodiplosis japonensis* larvae. *Entomol. Sin.*, 8 (1): 81—88.
- MacMillan HA, Guglielmo CG, Sinclair BJ, 2009. Membrane remodeling and glucose in *Drosophila melanogaster*: A test of rapid cold-hardening and chilling tolerance hypotheses. *J. Insect Physiol.*, 55 (3): 243—249.
- Michaud M, Denlinger D, 2006. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.*, 52 (10): 1073—1082.
- Michaud MR, Denlinger DL, 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J. Comp. Physiol.*, 177 (7): 753—763.
- Overgaard J, Malmendal A, Sorensen J, Bundy J, Loeschcke V, Nielsen NC, Holmstrup M, 2007. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 53 (12): 1218—1232.
- Overgaard J, Sorensen J, Petersen S, Loeschcke V, Holmstrup M, 2005. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in. *J. Insect Physiol.*, 51 (11): 1173—1182.
- Qin W, Neal SJ, Robertson RM, Westwood JT, Walker VK, 2005. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, 14 (6): 607—613.
- Rajamohan A, Sinclair BJ, 2008. Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.*, 54 (4): 708—718.
- Shintani Y, Ishikawa Y, 2007. Relationship between rapid cold-hardening and cold acclimation in the eggs of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothia hilaris*. *J. Insect Physiol.*, 53 (10): 1055—1062.
- Sinclair BJ, Chown SL, 2006. Rapid cold-hardening in a Karoo beetle, *Afrinus* sp. *Physiol. Entomol.*, 31 (1): 98—101.
- Wang HS, Kang L, 2005. Effect of cooling rates on the cold hardiness and cryoprotectant profiles of locust eggs. *Cryobiology*, 51 (2): 220—229.
- Wang XH, Kang L, 2003. Rapid cold hardening in young hoppers of the migratory locust *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acridiidae). *CryoLetters*, 24 (5): 331—340.
- Worland MR, Hawes TC, Bale JS, 2007. Temporal resolution of cold acclimation and de-acclimation in the Antarctic collembolan, *Cryptopygus antarcticus*. *Physiol. Entomol.*, 32 (3): 233—239.
- Yi SX, Lee RE, 2004. In vivo and in vitro rapid cold-hardening protects cells from cold-shock injury in the flesh fly. *J. Comp. Physiol.*, 174 (8): 611—615.
- Yi SX, Lee RE, 2011. Rapid cold-hardening blocks cold-induced apoptosis by inhibiting the activation of pro-caspases in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Apoptosis*, 16 (3): 249—255.
- Yi SX, Moore CW, Lee RE, 2007. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis. *Apoptosis*, 12 (7): 1183—1193.
- 景晓红, 康乐, 2002. 昆虫耐寒性研究. *生态学报*, 22 (12): 2202—2207.