

## Экофизиологические особенности холодной адаптации жуков *Upis ceramboides*, обитающих в Центральной Якутии

## Ecophysiological Peculiarities of Cold Adaptation of *Upis ceramboides* Beetles Habitant in Central Yakutia

Данные о температуре замерзания жука *Upis ceramboides*, а также о наличии в его гемолимфе нуклеаторов льда свидетельствуют о морозотолерантности этого вида насекомых. Результаты исследований показали высокую активность нуклеаторов льда, которые способны инициировать льдообразование при температуре  $-7^{\circ}\text{C}$ . Для исследуемых насекомых характерна большая водосохраняющая способность летом по сравнению с зимним периодом, вследствие снижения скорости дыхания. Возможно, это обусловлено экологическими особенностями обитания насекомых. Чувствительность *U. ceramboides* к скорости охлаждения и зависимость этого параметра от температуры среды свидетельствуют об особенностях механизма морозотолерантности, требующих более детального изучения.

**Ключевые слова:** холодоустойчивые насекомые, морозотолерантность, точка переохлаждения, нуклеаторы льда, осмоляльность, гемолимфа.

Дані щодо температури замерзання жука *Upis ceramboides*, а також наявності в його гемолімфі нуклеаторів льоду свідчать про морозотолерантність цього виду комах. Результати досліджень довели високу активність нуклеаторів льоду, які здатні ініціювати льодоутворення при  $-7^{\circ}\text{C}$ . Досліджувані комахи мають більшу здатність зберігати воду влітку, ніж взимку, внаслідок зниження швидкості дихання. Припускається, що це обумовлено екологічними умовами проживання комах. Чутливість *U. ceramboides* до швидкості охолодження та залежність цього параметра від температури середовища свідчать про особливості механізму морозотолерантності, які потребують більш детального вивчення.

**Ключові слова:** холодостійкі комахи, морозотолерантність, точка переохолодження, нуклеатори льоду, осмоляльність, гемолімфа.

The data on freezing temperature for *Upis ceramboides* beetle as well as presence in its hemolymph of ice nucleators testify to a cold-tolerance of this insect species. Research results have shown a high activity of ice nucleators, capable of initiating ice formation even at  $-7^{\circ}\text{C}$ . For the insects under study a high water-keeping ability in summer if compared with winter period is characteristic, pre-conditioned with a respiration rate reduction. It is likely stipulated with ecological peculiarities of their habitat. *U. ceramboides* sensitivity to cooling rate and dependence of this parameter on environmental temperature testify to the peculiarities of a cold-resistance mechanism, requiring a detailed study.

**Key-words:** cold resistance, freeze tolerance, over-cooling point, ice nucleators, osmolality, hemolymph.

Насекомые, обитающие в регионах с холодным климатом, должны быть морозотолерантными либо избегающими замерзания [4, 9, 13].

У морозотолерантных насекомых в гемолимфе присутствуют нуклеаторы льда, что обеспечивает контролируемое льдообразование без деструктивных процессов в клетках. Показано, что морозотолерантные насекомые в Канаде и на Аляске встречаются значительно чаще, чем в Скандинавии, для которой характерен более теплый климат [4, 18].

В соответствии с классификацией Lundheim различают адаптивные и случайные нуклеаторы льда [6]: вещества, инициирующие льдообразование в организме, обеспечивают реальное преимущество в преодолении суровых климатических условий и выполняют адаптивную функ-

Insects whose habitat is cold climate regions should be either cold-tolerant or avoiding freezing [4, 9, 13].

In cold-tolerant insects hemolymph there are ice nucleators providing the controlled ice formation with no destructive processes in cells. It has been shown that cold-tolerant insects in Canada and Alaska are found more frequently than in Scandinavia where warmer climate is characteristic [4, 18].

According to Lundheim's classification adaptive and incidental ice nucleators are distinguished [6]: substances initiating ice formation in an organism provide a distinct advantage in preventing severe climate conditions and accomplish adaptive functions; if the function of nucleators is not related to cold-resistant mechanism, they are incidental and likely participating in other physiological processes of an organism.

цию. Если функция нуклеаторов не связана с холодоустойчивым механизмом, они являются случайными и, вероятно, участвуют в других физиологических процессах организма.

Наличие адаптивных нуклеаторов льда в гемолимфе холодоустойчивых насекомых впервые установили Zachariassen и Hammel [17]. Было показано, что нуклеаторы – это соединения белковой природы, инициирующие замерзание внеклеточной жидкости насекомых при относительно высоких для данного процесса температурах ( $-7 \div -12^\circ\text{C}$ ).

Адаптивные нуклеаторы льда, находясь в гемолимфе, инициируют образование кристаллов льда, что вызывает отток жидкости из клеток во внеклеточную среду. При этом внутриклеточное содержимое концентрируется, а температура переохлаждения понижается. У некоторых насекомых дегидратация клеток сопровождается синтезом глицерола, что дополнительно понижает температуру переохлаждения и в целом повышает холодоустойчивость. Таким образом, нуклеаторы льда выступают в качестве внутриклеточных антифризов [4].

Для нуклеаторов льда характерна льдонуклеирующая активность (температура нуклеации льда), зависящая от концентрации растворенных веществ в среде, в которой происходит процесс нуклеации [11-14]. Эти характеристики важны для понимания механизма морозотолерантности и оценки холодоустойчивого эффекта у морозотолерантных насекомых.

Согласно данным [7, 18] морозотолерантные насекомые обладают менее эффективным водосохраняющим механизмом, чем виды, избегающие замерзания, что связано с физическим состоянием их гемолимфы в зимнее время. Сухой климат Якутии может влиять на водный баланс морозотолерантных насекомых.

Цель работы – изучить стратегию холодовой адаптации и связанное с ней состояние водного баланса жуков *Upis ceramoides*, обитающих в Центральной Якутии.

### Материалы и методы

Жуки *U. ceramoides* относятся к семейству *Tenebrionidae* (Coleoptera). Насекомые зимуют под корой погибших деревьев (береза, сосна), иногда выше уровня снежного покрова и в зимнее время подвергаются воздействию экстремально низких температур ( $-45 \div -55^\circ\text{C}$ ).

Насекомых (имаго) собирали в окрестностях г. Якутска в сентябре 2003 г. и выдерживали в течение зимы в условиях, приближенных к природным. Для экспериментов отбирали только живые экземпляры.

The presence of adaptive ice nucleators in hemolymph of cold-resistant insects was established for the first time by Zachariassen and Hammel [17]. The ice nucleators have been shown as the compounds of protein origin, initiating freezing of extracellular liquid of insects under relative high temperatures for this process ( $-7 \div -12^\circ\text{C}$ ).

Adaptive ice nucleators being in hemolymph initiate the formation of ice crystals that causes liquid out-flux from cells into extracellular medium. Herewith intracellular content is concentrated and overcooling temperature reduces. In some insects cell dehydration is accompanied by glycerol synthesis that in addition decreases overcooling temperature and in a whole increases cold-resistance. Thus ice nucleators act as intracellular antifreezes [4].

For ice nucleators ice-nucleating activity is characteristic (ice nucleation temperature), depending on concentration of dissolved substances in the medium where the nucleation occurs [11-14]. The parameters are important for understanding the mechanism of cold-tolerance and assessment of cold resistance in cold-hardy insects.

According to the data [7, 18] cold-tolerant insects have less effective water-preserving mechanism in comparison with the species avoiding freezing that is related to physical state of their hemolymph in winter period. Dry climate of Yakutiya in its turn may affect water balance of cold-tolerant insects.

The research aim was to study the strategy of cold adaptation and associated with it state of water balance of *Upis ceramoides* beetles habitant in Central Yakutia.

### Materials and methods

*U. ceramoides* beetles are referred to the *Tenebrionidae* (Coleoptera) family. The insects overwinter under the rind of dead trees (birch tree, pine) sometimes higher than snow mantle and in winter period are subjected the effect of extreme low temperatures ( $-45 \div -55^\circ\text{C}$ ).

Insects (imago) were gathered in the vicinity of the city of Yakutsk in September 2004 and were kept within the winter under conditions close to natural ones. For the experiments only living individuals were chosen.

Overcooling temperature for the insects was measured with a traditional method [5]. In this case freezing temperature was recorded with sensitive thermocouple adjusted to ventral side of the insects and fixed with scotch tape and then connected to a recorder. The insects were cooled in a fridge with the rate approximately  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  up to spontaneous freezing. Overcooling temperature was recorded at the moment of the liberation of heat, released during the transition of body's liquid into a solid state.

Температуру переохлаждения насекомых измеряли в соответствии с общепринятым методом [5]. При этом температуру замерзания регистрировали с помощью чувствительной термодпары, которую прикрепляли к вентральной стороне насекомых, фиксировали с помощью скотча и соединяли с регистрирующим самописцем. Насекомых охлаждали в холодильнике со скоростью примерно 1°C/мин до спонтанного замерзания. Температуру переохлаждения регистрировали в момент выделения тепла, освобождаемого при переходе жидкости тела насекомого в твердое состояние.

Насекомых относили к морозотолерантным, если после замерзания и последующего отогрева они сохраняли способность к координированному движению и дыханию.

Образцы гемолимфы получали путем прокалывания имаго *U. ceramboides* в области брюшка тонким стеклянным капилляром. Чтобы предотвратить испарение и окисление гемолимфы, образцы изолировали внутри капилляра с помощью капель минерального масла. Для определения осмоляльности гемолимфу (5 нл) отбирали из капилляра специально изготовленным микрошприцом.

Осмоляльность гемолимфы насекомых определяли по значению температуры плавления с помощью осмометра (Otago, Новая Зеландия) [12]. Гемолимфу наносили на поверхность пор измерительной ячейки, которые предварительно заполняли минеральным маслом. Ячейку охлаждали до замерзания образца, затем его медленно отогревали. Температурой плавления считали температуру, при которой лед полностью исчезал.

Для определения гистерезиса растаявший образец вновь замораживали, затем медленно отогревали и выдерживали 1 мин при температуре ниже температуры плавления, при этом в образце оставалось несколько кристаллов. После этого образец с гемолимфой вновь медленно охлаждали со средней скоростью 0,1°C до тех пор, пока не начинался быстрый рост кристаллов. Температуру, при которой начинается рост кристаллов, приняли за гистерезисную температуру замерзания [12].

Для проведения теста на наличие нуклеаторов льда образец гемолимфы центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин для удаления гемоцитов, влияющих на льдонуклеирующую активность гемолимфы.

Присутствие нуклеаторов льда в гемолимфе выявляли с помощью метода [15]. Каждый образец готовили в тонких стеклянных капиллярах по принципу “сэндвича”: раствор NaCl (5 мкл) находился между слоями минерального масла, гемолимфу (5 нл) вводили в раствор NaCl с помощью микрошприца.

The insects were referred to cold-tolerant if after freezing and following thawing they preserve the ability of coordinated movement and respiration.

Hemolymph samples were obtained by pinning of *U. ceramboides* imago in belly site with a glass capillary. To prevent evaporation and oxidation of hemolymph the samples were isolated inside a capillary with the mineral oil drops. To examine osmolality the hemolymph (5 nl) was removed from a capillary with specially designed micro-syringe.

Hemolymph osmolality of insects was examined on the value of melting temperature with osmometer (Otago, New Zealand) [12]. Hemolymph was layered on a surface of measuring cell pores, preliminarily filled with mineral oil. The cell was cooled down to a sample freezing then it was slowly thawed. The temperature under which an ice completely disappeared was considered as melting one.

To determine hysteresis the melted samples was repeatedly frozen and then slowly thawed and maintained for 1 min at the temperature lower the melting one, herewith in a sample some crystals remained. Afterwards the sample with hemolymph was once again slowly cooled with an average rate until a rapid growth of crystals starts. Temperature under which the growth of crystals starts was assumed as hysteresis freezing temperature [12].

To test the presence of ice nucleators the hemolymph sample was centrifuged at 3,000g for 5 min to remove hemocytes affecting ice-nucleating activity of hemolymph.

The presence of ice nucleators in hemolymph was revealed with the method [15]. Each sample was prepared in a thin glass capillaries on “sandwich” principle: NaCl solution (5  $\mu$ l) was between the layers of mineral oil, hemolymph (5 nl) was introduced into NaCl solution by means of micro-syringe.

For the measurement three similar capillaries were prepared, they were fixed with scotch tape and introduced the end of measuring thermocouple between them. Obtained sample was slowly cooled with the rate of 1°C/min until freezing temperature of samples was recorded as the heat released at solution crystallization. In the experiment there were used the following NaCl concentrations: 0.509, 0.998, 1.500 and 1.991 mOsm.

Aqueous balance was estimated on the rate of weight loss for *U. ceramboides* species during respiration process. The weight loss was found by weighing of the insects before and after keeping them in closed boxes at 20°C where with silica gel 5% humidity was maintained. During the experiment the insects were not fed therefore the weight loss because of excrements was excluded.

Oxygen consumption rate was measured with glass respirometer at 20°C with the methods [1].

Для измерения готовили три одинаковых капилляра, скрепляли их скотчем и вводили между ними конец измерительной термодпары. Полученный образец медленно охлаждали со скоростью 1°C/мин до тех пор, пока температура замерзания образцов не была зарегистрирована в виде тепла, высвобождаемого при кристаллизации раствора. В эксперименте использовали следующие концентрации NaCl: 0,509; 0,998; 1,500 и 1,991 мОсмоль.

Водный баланс оценивали по скорости потери веса особей *U. ceramboides* в процессе дыхания. Потерю веса определяли путем взвешивания насекомых до и после выдерживания их в закрытых бюксах при 20°C, где с помощью силикагеля поддерживали 5%-ю влажность. В ходе экспериментов насекомые не питались, поэтому потеря веса за счет экскрементов была исключена.

Скорость поглощения кислорода измеряли при помощи стеклянного респирометра при 20°C по методике [1].

Результаты представлены в виде средних значений измерений и их стандартных отклонений с помощью статистического пакета Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Стратегии холодоустойчивости (избегание замерзания и толерантность к замерзанию) характеризуются температурой переохлаждения, величиной осмоляльности, температурой плавления, гистерезисной активностью гемолимфы насекомых, наличием нуклеаторов льда и антифризов [4, 9, 10, 12].

Ежемесячные измерения температуры переохлаждения имаго *U. ceramboides* в течение 2003-2004 гг. показали, что они замерзают при относительно высоких отрицательных температурах, оставаясь при этом живыми. Из рис. 1 видно, что температура переохлаждения понижается в наиболее холодные месяцы, но не опускается ниже -12°C. Постепенное понижение температуры переохлаждения обусловлено частичной потерей воды организмом и повышением осмоляльности внеклеточной жидкости, а также накоплением полиолов. Довольно высокая температура переохлаждения насекомого свидетельствует о наличии нуклеаторов льда в гемолимфе.

Используя метод [15], мы показали присутствие нуклеирующих агентов в гемолимфе зимних особей *U. ceramboides*.

После внесения гемолимфы насекомых в растворы NaCl различной осмоляльности наблюдали повышение температуры замерзания раствора, что свидетельствует о наличии в гемолимфе нуклеаторов льда (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что осмоляльность среды оказывает большое влияние на проявление нуклеи-

The results are represented as means of the measurements and their standard deviations using Statistica 2.0 software.

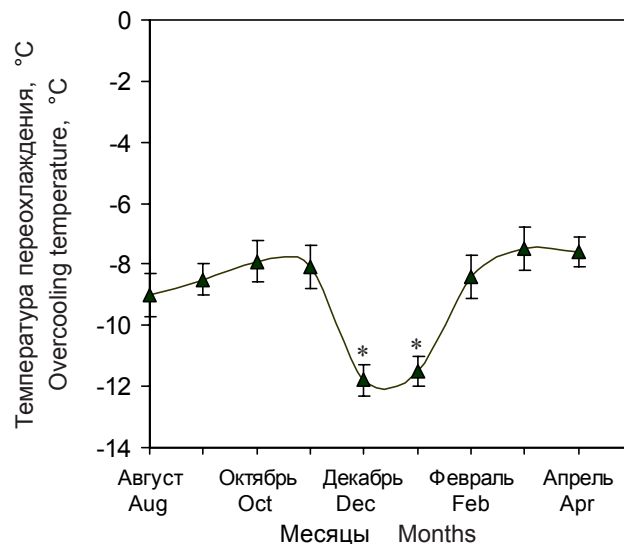
### Results and discussion

Cold resistance strategies (avoiding freezing and freeze-tolerance) are characterized with overcooling temperature, the value of osmolality, melting temperature, hysteresis activity of insect's hemolymph, presence of ice nucleators and anti-freezes [4, 9, 10, 12].

Monthly measurements of cooling temperature for *U. ceramboides* imago within 2003-2004 years have shown that they freeze under relatively high negative temperatures remaining alive herewith (Fig 1). Fig 1. demonstrates that overcooling temperature decreases within the coldest months but does not reduce lower than -12°C. Gradual reduction of overcooling temperature is stipulated by a partial loss of water by an organism and rise in osmolality of extracellular liquid as well as accumulation of polyols. Quite a high temperature of insect overcooling testifies to the presence of ice nucleators in hemolymph.

Using the method [15] we have demonstrated the presence of nucleating agents in hemolymph of winter individuals of *U. ceramboides*.

After insect hemolymph introduction into NaCl solutions of various osmolalities a rise in freezing temperature was observed an increase in freezing



**Рис. 1.** Температура переохлаждения *U. ceramboides* по месяцам (2003-2004 гг.). Каждая точка кривой представляет среднее значение ежемесячных измерений температуры переохлаждения жука ( $n=4$ )  $\pm$  стандартное отклонение. \* – достоверные различия по сравнению с периодом весна-осень,  $p<0,05$ .

**Fig. 1.** Overcooling temperature for *U. ceramboides* by months (2003-2004 years). Each point of the curve represents a mean value of monthly measurements of beetle overcooling temperature ( $n=4$ )  $\pm$  SD. \* – statistically significant differences comparing to spring-autumn months,  $p<0.05$ .

рующей активности. Величина осмоляльности гемолимфы отражает уровень содержания осмотически активных веществ, многие из которых обладают криопротекторными свойствами (глицерол, сахара и др.), и является одним из основных параметров механизма холодоустойчивости насекомых.

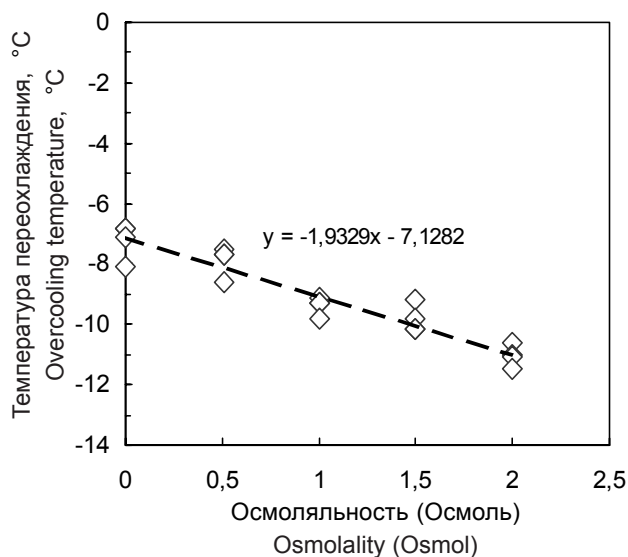
В работе [12] при изучении скандинавских и африканских жуков показано, что осмоляльность гемолимфы летних насекомых составляет 400-600 мОсмоль/кг. При накоплении полиолов осмоляльность гемолимфы в зимний период может возрастать до 3000 мОсмоль/кг и более. Поскольку повышение осмоляльности является результатом аккумуляции осмотически активных веществ, главным образом полиолов, то ее величина может быть индикатором наличия полиолов.

Измеренные физиологические параметры обитающих в Якутии жуков *U. cerambooides*, характеризующие их морозотолерантность, таковы: температура переохлаждения  $-7,0 \pm 0,65^\circ\text{C}$ ; величина осмоляльности гемолимфы  $930,0 \pm 5,5$  мОсмоль; температура плавления  $-2,0 \pm 0,35^\circ\text{C}$ ; содержание воды  $52,0 \pm 2,3^\circ\text{C}$  ( $n=4$ ; измерения были проведены в январе 2005 г). Наши исследования биохимического состава гемолимфы *U. cerambooides* не выявили наличия в ней глицерола, что согласуется с данными [3], согласно которым в гемолимфе *U. cerambooides* отсутствует глицерол, и вместо него синтезируются трейтол и сорбитол.

Гемолимфа *U. cerambooides* не обладает гистерезисной активностью, что свидетельствует об отсутствии в ней антифризных белков. Переохлажденное жидкое состояние насекомых является метастабильным – при понижении температуры в такой системе может происходить внезапный и спонтанный рост кристаллов. Антифризные белки, обладающие гистерезисной активностью, стабилизируют переохлажденное жидкое состояние, понижая температуру спонтанного роста кристаллов. Поэтому синтез антифризных белков является важнейшей характеристикой прежде всего насекомых, избегающих замерзания [12, 18].

Стратегия морозотолерантности обеспечивает определенные преимущества насекомым в отношении водного баланса [7] по сравнению с видами, избегающими замерзания. Эти различия в водном балансе указанных категорий насекомых проявляются в том, что для кутикулы морозотолерантных насекомых, как правило, характерна хорошая водная проницаемость, а для кутикулы насекомых, избегающих замерзания, – очень низкая водопроницаемость, сравнимая с таковой у пустынных жуков [7].

Сравнительное изучение водного баланса летних и зимних особей жука *U. cerambooides* (с



**Рис. 2.** Температура переохлаждения 5 мкл раствора NaCl, содержащего 5% (об/об) гемолимфы *U. cerambooides*, представленная как функция концентрации раствора NaCl, выраженной в единицах осмоляльности.

**Fig. 2.** Overcooling temperature of 5 ml NaCl solution, containing 5% (w/w) hemolymph of *U. cerambooides*, presented as the function of NaCl solution concentration, represented in osmolality units.

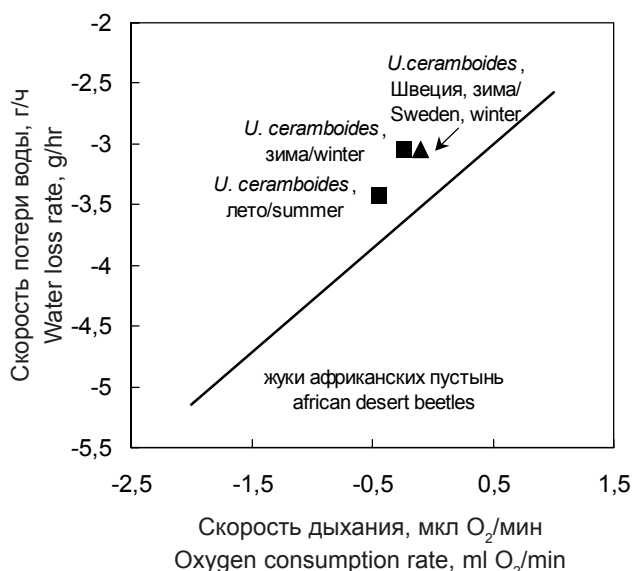
temperature of the solution, testifying to the presence of ice nucleators in hemolymph (Fig. 2).

Fig 2. shows that medium osmolality affects greatly the manifestation of nucleating activity. The value of osmolality of hemolymph reflects the content level for osmotically active substances, many of those have cryoprotective properties (glycerol, sugars etc.) and is one of the main parameters of insect cold resistance mechanism.

In the paper [12] when studying Scandinavian and African beetles it has been shown that osmolality of hemolymph of summer insects makes 400-600 mOsm/kg. During accumulation of polyols the hemolymph osmolality in winter period may increase up to 3,000 mOsm/kg and higher. Since a rise in osmolality is the result of accumulation of osmotically active substances mainly polyols then its value may indicate their presence.

Measured physiological parameters of habitant in Yakutia *U. cerambooides* beetles, characterizing their freeze-tolerance are as follows: overcooling temperature is  $7.0 \pm 0.65^\circ\text{C}$ ; the value of hemolymph osmolality is  $930.0 \pm 5.5$  mOsm; melting temperature is  $2.0 \pm 0.35^\circ\text{C}$ , water content is  $52.0 \pm 2.3^\circ\text{C}$  ( $n=4$ ; measured in January 2005). Our researches of biochemical composition of hemolymph *U. cerambooides* did not reveal the presence of glycerol in it, that corresponded to the data [3] stating about the absence of glycerol in hemolymph of *U. cerambooides* and synthesizing of treitol and sorbitol instead of it.

*U. cerambooides* hemolymph does not possess hysteresis activity that testifies to the absence of



**Рис. 3.** Двойной логарифмический график скорости дыхания и скорости потери веса у зимних и летних особей жуков *U. ceramboides*, построенный относительно регрессионной линии для пустынных жуков Африки [4]. Для сравнения приведены данные для *U. ceramboides* шведской популяции [4].

**Fig. 3.** Double logarithm graph of respiration rate and weight loss rate in winter and summer species of *U. ceramboides* beetles, plotted in respect of regression line for African desert beetles [4]. To compare there are presented the data for Swedish population of *U. ceramboides* [4].

использованием регрессионной зависимости, полученной в [7] для пустынных жуков Африки) показало, что жуки обладают большей способностью сохранять воду в своем организме летом, чем зимой за счет снижения скорости дыхания (рис. 3). Лето в Якутии, как правило, сухое и жаркое, микроклимат в местах обитания *U. ceramboides* (под корой умерших деревьев) сходен с микроклиматом африканских саванн (персональные данные). Поэтому эти жуки, имеющие высокую проницаемость кутикулы, приспосабливаются к жарким и сухим условиям летнего периода в Якутии за счет снижения скорости дыхания, что приводит к уменьшению потери воды в их организме. Вероятно, этим можно объяснить более высокую способность удерживать воду летними особями, по сравнению с зимними насекомыми. Для выяснения адаптивных механизмов, направленных на поддержание оптимального уровня воды в организме без ущерба для холодоустойчивости, необходимо провести более детальные исследования водного баланса жуков якутской популяции *U. ceramboides* в описанных климатических условиях.

В работе [8] показано, что *U. ceramboides* имеет несколько интересных аспектов холодоустойчивости. Они чрезвычайно чувствительны к скорости охлаждения. Для достижения макси-

antifreeze proteins in it. Overcooled liquid state of insects is metastable at temperature decrease in such a system an abrupt and spontaneous growth of crystals may occur. Antifreeze proteins having hysteresis activity stabilizes an overcooled liquid state by reducing the temperature of crystal spontaneous growth. Therefore the synthesis of antifreeze proteins is the most important parameter of insects avoiding freezing [12, 18].

Strategy of cold tolerance provides certain advantages to the insects in respect of aqueous balance [7] if compared with the species avoiding freezing. These differences in aqueous balance of the mentioned categories of insects manifest in the fact that for cuticle of freeze-tolerant insects as a rule good water penetrability is characteristic and very low penetration ability compared with those in desert beetles for the cuticle of those avoiding freezing.

Comparative study of aqueous balance of winter species of *U. ceramboides* beetles (using regression dependence obtained in [7] for desert beetles of Africa) has shown that the beetles possess a higher ability to preserve water in its organism in summer than in winter due to a decrease in respiration rate (Fig. 3). Summer in Yakutia as a rule is dry and hot, microclimate in *U. ceramboides* habitat (under rind of dead trees) is similar to one of African savannas (personal data). Therefore these beetles with a high penetrability of cuticle adapt to hot and dry conditions of summer period in Yakutia due to reduction in the respiration rate, resulting in a decrease in water loss in their organism. This may probably explain higher ability to keep water by summer individuals if compared with winter insects. To reveal adaptive mechanisms directed to maintenance of optimal water leveling an organism with no harm for cold resistance it is necessary to investigate in details the water balance in beetles of Yakut population of *U. ceramboides* under described climate conditions.

The research [8] depicts that *U. ceramboides* have some interesting aspects of cold resistance. They are quite sensitive to a cooling rate. To achieve maximum freeze-tolerance at  $-50^{\circ}\text{C}$  the rate lower than  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  is essential, and increase in the rate down to  $0.35^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sharply enhances death rate. Drastic cooling of beetles during early autumn (quite common phenomenon in regions with seasonal inland climate) results in high death rate of beetles at  $-50^{\circ}\text{C}$ .

## Conclusions

Thus using the data on freezing temperature as well as test for presence of nucleating agents in hemolymph of *U. ceramboides* may be referred to freeze-tolerant insects. Obtained results testify to a high activity of nucleating components in hemolymph of insects capable of initiating ice formation even at  $-7^{\circ}\text{C}$ .

мальной морозотолерантности при  $-50^{\circ}\text{C}$  необходима скорость менее  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , а повышение скорости до  $0,35^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  резко увеличивает их смертность. Резкое охлаждение жуков ранней осенью (практически обычное явление в регионах с резко континентальным климатом) приводит к высокой смертности жуков при  $-50^{\circ}\text{C}$ .

### Выводы

Таким образом, на основании данных о температуре замерзания, а также теста на наличие нуклеирующих агентов в гемолимфе *U. ceramboides* можно отнести к морозотолерантным насекомым. Полученные результаты свидетельствуют о высокой активности нуклеирующих компонентов в гемолимфе насекомых, способных инициировать льдообразование уже при температуре  $-7^{\circ}\text{C}$ .

Значения водоудерживающей способности жуков *U. ceramboides* якутской и скандинавской популяций сходны, однако в летний период насекомые якутской популяции имеют более эффективную водоудерживающую способность благодаря снижению скорости дыхания.

Чувствительность *U. ceramboides* к скорости охлаждения свидетельствует о наличии особенностей механизма морозотолерантности, требующих более детального изучения.

*Исследования были проведены при поддержке гранта РФФИ Арктика 06-04-96048 (2006-2008 гг.) и Норвежского университета наук и технологий (г.Трондхейм). Автор выражает благодарность профессору Zachariassen K.E. за методическую помощь в проведении экспериментов.*

### Литература

1. Грин Н., Стаут У., Тэйлор Д. Биология.— М.: Мир, 1990.— 75 с.
2. Block W. Cold tolerance of insects and other arthropods // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.— 1990.— Vol. 326, N1237.— P. 613-633.
3. Block W. Cold hardiness in invertebrate poikilotherms // Comp. Biochem. Physiol. A. — 1982. — Vol. 73, N4. — P. 581-595.
4. Duman J.G., Wu D.W., Xu L., et al. Adaptations of insects to subzero temperature // Quart. Rev. Biol.— 1991.— Vol. 66, N4.— P. 407.
5. Laak van der S. Physiological adaptations to low temperature in freezing-tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // Comp. Biochem. Physiol. A.— 1982.— Vol. 73, N4.— P.613-621.
6. Lundheim R. Adaptive and incidental biological ice nucleator.: Dr. scient. thesis.— Trondheim, 1996.— P. 11.
7. Lundheim R., Zachariassen K.E. Water balance of overwintering beetles in relation to strategies for cold tolerance // J. Comp. Physiol. B.— 1993.— Vol. 163, N1.— P. 1-4.

Values of water-keeping ability of *U. ceramboides* beetles of Yakut and Scandinavian populations are similar however in summer period the insects of Yakut population have more effective water-keeping ability due to reduction of respiration rate.

*U. ceramboides* sensitivity to cooling rate gives an evidence to the presence of freeze-tolerance mechanism peculiarities demanding a detailed study.

*The investigations were supported by the grant RFFI Arctica 06-04-96048 (2006-2008) and the Norwegian University of Science and Technology (Trondheim). The author expresses the acknowledgements to Prof. Zachariassen K.E. for the methodical assistance in performing the experiments.*

### References

1. Green N., Stout W., Taylor D. Biology.— Moscow: Mir, 1990.— 75 p.
2. Block W. Cold tolerance of insects and other arthropods // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.— 1990.— Vol. 326, N1237.— P. 613-633.
3. Block W. Cold hardiness in invertebrate poikilotherms // Comp. Biochem. Physiol. A. — 1982. — Vol. 73, N4. — P. 581-595.
4. Duman J.G., Wu D.W., Xu L., et al. Adaptations of insects to subzero temperature // Quart. Rev. Biol.— 1991.— Vol. 66, N4.— P. 407.
5. Laak van der S. Physiological adaptations to low temperature in freezing-tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // Comp. Biochem. Physiol. A.— 1982.— Vol. 73, N4.— P.613-621.
6. Lundheim R. Adaptive and incidental biological ice nucleator.: Dr. scient. thesis.— Trondheim, 1996.— P. 11.
7. Lundheim R., Zachariassen K.E. Water balance of overwintering beetles in relation to strategies for cold tolerance // J. Comp. Physiol. B.— 1993.— Vol. 163, N1.— P. 1-4.
8. Miller K. Cold hardiness strategies of some adult and immature insects overwintering in interior Alaska // Comp. Biochem. Physiol. A.— 1993.— Vol. 73, N4.— P. 595-605.
9. Salt R.W. Principles of insect cold hardiness // Annu. Rev. Entomol.— 1961.— Vol. 6.— P. 55-74.
10. Somme L. Effect of glycerol on cold-hardiness in insects // Can. J. Zool.— 1964.— Vol. 42, N1— P. 89-100.
11. Zachariassen K.E., Kristiansen E., Pedersen S.A., Hammel H.T. Ice nucleation in solutions and freeze-avoiding insects — homogeneous or heterogeneous? // Cryobiology.— 2004.— Vol. 48, N3 — P. 309-321.
12. Zachariassen K.E. Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev.— 1985.— Vol. 65, N4.— 832 p.
13. Zachariassen K.E. Ice nucleating agents in cold-hardy insects / In: Water and Life. Eds: Somero et al.— Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992.— P. 261-281.
14. Zachariassen K.E. Nucleating agents in cold-hardy insects // Comp. Biochem. Physiol. A.— 1982.— Vol. 73, N4.— P. 557-562.
15. Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.J. A method for quantitative determination of ice nucleating agents in insect hemolymph // Cryobiology.— 1982.— Vol. 19, N2.— P. 180-184.
16. Zachariassen K.E., Hammel H.T. The effect of ice-nucleating agents on ice-nucleating activity // Cryobiology.— 1988.— Vol. 25, N2.— P. 143-147.

8. *Miller K.* Cold hardiness strategies of some adult and immature insects overwintering in interior Alaska // *Comp. Biochem. Physiol. A.*– 1993.– Vol. 73, N4.– P. 595-605.
9. *Salt R.W.* Principles of insect cold hardiness // *Annu. Rev. Entomol.*– 1961.– Vol. 6.– P. 55-74.
10. *Somme L.* Effect of glycerol on cold-hardiness in insects // *Can. J. Zool.*– 1964.– Vol. 42, N1– P. 89-100.
11. *Zachariassen K.E., Kristiansen E., Pedersen S.A., Hammel H.T.* Ice nucleation in solutions and freeze-avoiding insects – homogeneous or heterogeneous? // *Cryobiology.*– 2004.– Vol. 48, N3 – P. 309-321.
12. *Zachariassen K.E.* Physiology of cold tolerance in insects // *Physiol. Rev.*– 1985.– Vol. 65, N4.– 832 p.
13. *Zachariassen K.E.* Ice nucleating agents in cold-hardy insects / In: *Water and Life.* Eds: Somero et al.– Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992.– P. 261-281.
14. *Zachariassen K.E.* Nucleating agents in cold-hardy insects // *Comp. Biochem. Physiol. A.*– 1982.– Vol. 73, N4.– P. 557-562.
15. *Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.J.* A method for quantitative determination of ice nucleating agents in insect hemolymph // *Cryobiology.*– 1982.– Vol. 19, N2.– P. 180-184.
16. *Zachariassen K.E., Hammel H.T.* The effect of ice-nucleating agents on ice-nucleating activity // *Cryobiology.*– 1988.– Vol. 25, N2.– P. 143-147.
17. *Zachariassen K.E., Hammel H.T.* Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing // *Nature.*– 1976.– Vol. 262, N5566.– P. 285-287.
18. *Zachariassen K.E., Kristiansen E.* What determines the strategy of cold-hardiness? // *Acta. Soc. Zool. Biochem.*– 2003.–Vol. 67, N1. – P. 51-58.

*Accepted in 01.02.2006*

*Поступила 01.02.2006*