

昆虫快速冷耐受的研究进展*

张小香^{1**} JUNAID Iqbal¹ 杜予州^{1,2***}

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院暨应用昆虫研究所, 扬州 225009;

2. 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州 225009)

摘要 快速冷耐受作为一种非常有效的耐寒策略,可在短时间内显著增强昆虫的耐寒性,使得昆虫能够在全球气候变暖的大背景下应对更加频繁的气候波动,具有重要的生态意义。快速冷耐受现象在昆虫中首次发现以来,得到了广泛的研究,尤其近年来,在其内在机制研究方面取得了很大进展。本文综述了近年来快速冷耐受现象的研究进展,对快速冷耐受的特征、生理生化和分子机制,以及生态学意义等进行了总结、归纳与分析,为昆虫快速冷耐受的研究提供参考。

关键词 快速冷耐受; 昆虫; 耐寒性; 生理生化; 分子机制

Advances in research on the rapid cold hardening of insects

ZHANG Xiao-Xiang^{1**} JUNAID Iqbal¹ DU Yu-Zhou^{1,2***}

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Joint Laboratory for International Cooperation in Agriculture and Agricultural Product Safety,

Ministry of Education, Yangzhou 225009, China)

Abstract Cold hardening is a very effective strategy used by insects to survive cold temperatures. Rapid cold hardening can significantly enhance the cold tolerance of insects within a short period of time, thereby enabling them to cope with fluctuating climatic conditions. Cold hardening is therefore an ecologically significant trait of insects in the context of global warming. Since its first discovery, rapid cold hardening has been widely studied, and great progress has been made in understanding the mechanism underlying this adaptation, especially in recent years. This paper reviews the latest research on rapid cold hardening, including its characteristics, physiological, biochemical and molecular mechanisms, and its ecological significance, in order to provide suggestions for further research on this subject.

Key words rapid cold hardening; insect; cold tolerance; physiological biochemistry; molecular mechanism

昆虫在经历较温和低温后,其抵抗低温伤害的能力增强的现象称为冷驯化(Bale, 1996)。根据驯化时间长短可将冷驯化分为两种类型,一种是长时间驯化,即昆虫通过几天甚至几周的低温锻炼,从而获得抗低温能力,这种驯化主要应对于间接冷伤害和结冰伤害;另一种是短时间驯化,也称快速冷耐受(Rapid cold hardening, RCH),是在几个小时甚至几十分钟抑或更短时

间内发生的冷驯化过程,主要应对于直接伤害或冷休克(Kim and Namho, 1997)。

Lee等(1987)研究发现,红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* Macquart 在 0 °C 下暴露 30 min 后其耐寒性就能得到显著提高,并首次提出了快速冷耐受的概念。昆虫经过快速冷耐受处理后,其行为或体内的生理状态发生一系列变化,如进入滞育或休眠状态,过冷却点降低,水

*资助项目 Supported projects: 江苏省科技支撑项目(BE2014410); 江苏现代农业(西甜瓜)产业技术体系(JATS [2020] 309); 扬州市科技计划项目(YZ2014171); 江苏省研究生研究与实践创新计划项目(KYCX18_2374)

**第一作者 First author, E-mail: 1157044080@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-12-13; 接受日期 Accepted: 2021-01-29

分减少,多元醇等抗冻小分子物质含量增加,以及抗冻蛋白和冰核出现等(王宪辉等,2003)。经过数十年研究,人们对快速冷耐受这一现象已经有了更为深入的认识。本文从快速冷耐受的特征与机制及其生态意义等方面进行综述,总结近年来国内外对快速冷耐受的研究进展。

1 快速冷耐受的含义

一般来说,冷驯化是指将昆虫长时间暴露于亚致死温度之上的相对温和低温,使其提高抵抗低温伤害的能力,在应对极端低温胁迫时,能显著提高其存活率的现象(Katherinea and Arya, 2010; Khodayari *et al.*, 2012; Jakobs *et al.*, 2015; Sinclair *et al.*, 2015)。冷驯化一般对应自然温度的季节性变化,处理温度较温和,在冷胁迫来临之前,生物体可在生理上做出应对,以减轻冷胁迫带来的伤害(Sinclair and Chown, 2003),其驯化需要较长时间(几天、几十天)完成。

快速冷耐受是指将昆虫短时间暴露于相对温和的低温下,使其耐寒性得到迅速提高的一种现象,其与冷驯化的区别主要是暴露在相对温和低温下的时间长短。最初,快速冷耐受被认为是发生在非滞育昆虫种类中的一种应对低温胁迫的快速保护机制,能够抵御1 d甚至1 h内的环境温度剧烈变化引起的冷伤害(Lee *et al.*, 1987; Kelty and Lee, 1999)。但随后的研究发现,滞育状态的昆虫也能产生快速冷耐受反应,例如处于滞育状态的捕食螨 *Euseius finlandicus* (Oudemans)也具有与非滞育状态相似的快速冷耐受现象(Broufasand and Koveos, 2001)。能迅速提高昆虫耐寒能力的诱导条件也不仅限于低温处理,有的在短时高温暴露、缺氧或紫外线照射也能诱导耐寒性提高(Andersen *et al.*, 2013; Le Bourg, 2013; Gantz and Lee, 2015)。本文综述的快速冷耐受仅限于由低温处理引起的耐寒性提高的现象。经过多年的研究,快速冷耐受的定義得到了不断的补充与扩展。如今,快速冷耐受可以被定义为昆虫在应对短期低温暴露或温度急剧变化时自身产生的一种耐寒策略,能在有限的温度与时间范围内迅速提高昆虫的耐寒性,

降低昆虫自身可承受的临界低温,具有对温度调节的高效性,是昆虫应对外界短时低温胁迫以及温度急剧下降的重要生存对策(冯从经等,2007; Teets *et al.*, 2020)。

2 快速冷耐受的特征

2.1 诱导条件

在实验室研究中,通常是通过将实验对象转移到一个较温和的低温下($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $5\text{ }^{\circ}\text{C}$)处理一段时间(几分钟到几小时)以达到诱导快速冷耐受(RCH)的效果(Teets and Denlinger, 2013)。RCH诱导的最适温度范围存在物种特异性,例如 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间的温度能有效引起红尾肉蝇成虫的RCH(Chen *et al.*, 1987),而耐寒性较强的南极摇蚊 *Belgica antarctica* Jacobs 幼虫的最适诱导温度则在零度以下,低至 $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度也能有效地诱导其RCH(Kawarasaki *et al.*, 2013; Lee and Denlinger, 2015)。诱导温度和时间最佳交互效应也因物种而异,例如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner 成虫最佳的诱导组合为 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/4\text{ h}$ (Zheng *et al.*, 2014),而家蝇 *Musca domestica* L. 蛹和二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 幼虫的最佳诱导组合均为 $0\text{ }^{\circ}\text{C}/4\text{ h}$ (Coulson and Bale, 1990; Qiang *et al.*, 2008),西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 若虫或雌雄成虫经 $0\text{ }^{\circ}\text{C}/2\text{ h}$ 低温处理后,在 $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的存活率得到最大幅度提高(李鸿波等,2011)。虽然在每个物种中触发RCH的温度不同,但通常比 LT_{90} (某一时间内使90%昆虫个体致死所需的低温)高出 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的温度会有效地引发RCH效应。对大多数物种来说,最佳驯化时间在1-2 h内(Nyamukondiwa *et al.*, 2011; Teets *et al.*, 2020)。

然而,在自然温周期下温度瞬间降低几十摄氏度的情况并不存在,因此有一些研究在实验方法上采取模拟自然条件的缓慢降温来诱导RCH。例如将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 成虫以 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或 $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度从 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷却到 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 也可以引起其RCH(Kelty and Lee, 1999);将果蝇移到野外并定时检测耐

寒性, 结果表明在 1 d 中最冷的时间 (即 6: 00) 测试的个体比在其他时间测试的个体更耐寒 (Kelty, 2007); 在希腊的橄榄果蝇 *Bactrocera oleae* Gemlin 和丹麦的黑腹果蝇中也观察到类似的自然降温诱导 RCH (Koveos, 2001; Overgaard and Sørensen, 2008), 这些结果表明 RCH 使昆虫能及时根据温度波动来优化自身的耐寒性。

2.2 快速冷耐受的保护效应

快速冷耐受可以显著提高昆虫在低温下的存活率。例如二化螟的幼虫在 0 °C 下驯化 4 h 后, 其在识别温度下的存活率由 20% 左右提升到 50% (Qiang *et al.*, 2008); 红尾肉蝇蛹在 0 °C 放置 2 h 后, 可以把 -10 °C 2 h 下的羽化率由 20% 提高到大约 90% (Chen *et al.*, 1987)。当温度低于昏迷临界低温 (Critical thermal minimum, CTmin) 时, 昆虫的运动停止, 但 RCH 可以降低这一临界值, 例如非洲飞蝗 *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche & Fairmaire) 在 4 °C 下冷藏 4 h, 其 CTmin 从 (7.5±0.1) °C 降低到 (5.1±0.1) °C (Srithiphaphirom *et al.*, 2019)。此外, RCH 还能促进某些昆虫更快地从冷昏迷中恢复, 例如对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 若虫来说, RCH 能将冷休克恢复所需的时间减少约 15% (Findsen *et al.*, 2013), 而这一效应在成虫身上并不明显, 如通过 4.5 °C 冷藏 3 h 或 0 °C 冷藏 2 h 的预处理并不缩短成虫从亚致死性低温胁迫中恢复的时间 (Rako and Hoffmann, 2006), 这表明加快冷昏迷后的恢复只存在部分昆虫中, 并不是 RCH 的一般特征。

另外, RCH 还能为昆虫在低温下的生存提供能量并提高他们的适合度, 例如直接冷冻处理 24 h 后的南极摇蚊幼虫, 其糖原储存基本耗尽, 而那些在冷冻前经过 RCH 处理的幼虫则能更久地保持它们的糖原储存, 提高了南极摇蚊幼虫的存活率 (Teets *et al.*, 2019)。对于红尾肉蝇, 冷休克会降低成虫的寿命, 超过 75% 的个体在羽化后 10 d 内死亡, 然而, 在低温胁迫之前经过 RCH 处理, 85% 的个体寿命比对照组的寿命长 10 d 以上。冷休克对繁殖能力也有影响, 羽化后存活

到第 10 天的雄虫, 其授精率仅为 8.4%, 但 RCH 则可以降低这种对繁殖能力的影响, 并将授精率提高至 42.2% 左右 (Rinehart *et al.*, 2000)。

值得注意的是, RCH 期间获得的保护效应在重新升温后很快就会失去。将昆虫驯化完立即转移到较高的温度后, 经过快速冷耐受获得的抗寒能力会很快地消失, 保持的时间一般不超过几个小时。例如家蝇的蛹经过最佳的驯化条件 (0 °C/3 h) 的处理再放回到原来的饲养温度 (27 °C) 2 h 后, 其存活率与未经驯化的对照组无差别 (Coulson and Bale, 1990); 西花蓟马经快速冷耐受后再将其转移至 20 °C, 随着恢复时间的延长, 其在亚致死温度下的存活率也缓慢降低 (Walters *et al.*, 1997)。这可能是因为冷胁迫信号消失后, 机体会优先将能量用于繁殖, 使得昆虫再次面对低温胁迫时准备不足而受到二次伤害 (杨友福, 2018)。

2.3 适合度代价

与其他冷驯化反应一样, 快速冷耐受反应在提高了低温胁迫下昆虫存活率的同时, 不可避免地会对适合度的其他方面产生影响, 例如西花蓟马若虫经 0 °C 处理 2 h 后, 其发育历期, 羽化后成虫的产卵量显著降低; 成虫经过低温处理后, 其寿命、产卵量和产卵时间明显降低 (李鸿波等, 2011); 对于果蝇, RCH 能降低实验种群的耐热性 (Overgaard and Sørensen, 2008); 在 4 °C 下冷藏 2 h 也会降低黑腹果蝇雄性的交配效率, 表现为求偶时间的延长和交配率的下降 (Everman *et al.*, 2018)。这表明昆虫可能在耐寒性和其他能力之间进行了权衡取舍。

3 快速冷耐受的机制

3.1 生理生化机制

低温保护剂的合成是变温动物通过季节性冷驯化提高耐寒性的机制之一 (Salt, 1961)。一些研究验证了 RCH 也能诱导低温保护剂的合成。在红尾肉蝇 RCH 的代谢组分析中发现, 5 种代谢物的浓度在驯化过程中增加, 包括典型的冷冻保护剂 - 甘油和山梨醇 (Michaud and

Denlinger, 2007); 在黑腹果蝇中, RCH 引起了葡萄糖和海藻糖含量的增加 (Overgaard *et al.*, 2007); 在一些鳞翅目昆虫中, RCH 期间能观察到低温保护剂甘油或海藻糖水平增加 (Park and Kim, 2014; Kim *et al.*, 2017); 但也有报道在 RCH 过程中没有葡萄糖的合成 (MacMillan *et al.*, 2009)。总之, 在大多数昆虫中, RCH 过程促进了低温保护剂的合成, 但是在 RCH 过程中观察到的低温保护剂的提升量远远低于季节性冷驯化过程中所观察到的提升量。

RCH 伴随的另一个生理生化机制就是能引起细胞膜的修饰。生物体通过调整其细胞膜的组成成份以便在不同温度下保持细胞膜的流动性 (Sinensky, 1974), 这一过程已被确认为昆虫抗寒的重要机制之一 (Kostal, 2010)。黑腹果蝇的细胞膜在 RCH 过程中发生了结构重组, 其细胞膜中的亚油酸含量增加, 细胞膜流动性提高 (Overgaard *et al.*, 2005)。类似地, 对于红尾肉蝇, RCH 也会引起细胞膜的油酸含量增加, 进而提高细胞膜在低温下的流动性 (Lee *et al.*, 2006; Michaud and Denlinger, 2006)。此外, 研究发现以不同的降温速率(0.5、0.1、0.01 °C/min)诱导产生的 RCH, 其对细胞膜的组成成分产生的影响也不同。以 0.5 °C/min 或 0.1 °C/min 的速度从 25 °C 降至 0 °C, 黑腹果蝇细胞膜的流动性增加是由亚油酸含量增加引起的, 而以 0.01 °C/min 的速度降温时, 细胞膜流动性的变化则主要由软油酸和油酸的含量变化引起 (Overgaard *et al.*, 2006)。然而, 与低温保护剂的积累一样, 在有些研究中, 并没有观察到 RCH 引起细胞膜成分变化的现象 (MacMillan *et al.*, 2009)。

3.2 分子机制

3.2.1 转录调控 普通的冷休克会引起昆虫的应激反应, 包括相关基因的转录调控, 典型的如热激蛋白家族基因 (Lu *et al.*, 2016, Chang *et al.*, 2019, 2020)。在稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel 的 RCH 过程中, 观察到热激蛋白基因明显上调 (Yang *et al.*, 2018); 桔小实

蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel 在 RCH 过程中检测到编码钙离子或钙离子调素蛋白激酶 II (一种参与 RCH 的信号蛋白) 基因的上调 (Ahn *et al.*, 2018); 在某些昆虫的 RCH 过程中还观察到编码代谢酶基因的上调, 如参与甘油和海藻糖合成的基因 (Park and Kim, 2014; Kim *et al.*, 2017)。对黑腹果蝇进行的微阵列分析发现, 在 RCH 过程中有 37 个差异表达的基因 (Qin *et al.*, 2005)。然而, 并不是所有昆虫的 RCH 都涉及转录水平的变化。一些研究表明, 在驯化后立即进行基因表达水平分析后发现, RCH 过程中并不需要合成新的基因产物, 例如在黑腹果蝇中, 与冷休克恢复相关的基因 (如热激蛋白) 在诱导 RCH 的过程中没有差异表达 (Sinclair *et al.*, 2007)。对黑腹果蝇的进一步研究表明, 在 RCH 过程中所研究的 219 个基因没有受到差异调控, 而在经过冷驯化的野生果蝇体内也只有 1 个基因 (*P5cr*) 上调, 2 个基因 (*Eip71CD* 和 *cwo*) 下调 (Vesala *et al.*, 2012)。在红尾肉蝇中, 由 0 °C 处理 2 h 诱导的 RCH 可显著提高耐寒性, 但并不引起基因表达上的变化 (Teets *et al.*, 2012)。因此, RCH 是否能引起转录水平的变化并不是一个普遍现象, 对某些昆虫来说, RCH 过程中的转录调控是其提高耐寒性的重要分子机理, 而对一些昆虫来说则不会因 RCH 而引起基因转录调控的变化。

3.2.2 蛋白质合成 RCH 还涉及蛋白质水平的变化。短时低温处理能使亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 体内一种抗冻特异蛋白的表达量提高 (冯从经等, 2007)。对红尾肉蝇的大脑进行研究后发现, 38 种蛋白质的表达量在对照组和 RCH 处理组中差异很大。经质谱鉴定, 其中 14 种蛋白质在 RCH 过程中表达上调, 包括 ATP 合成酶、热激蛋白 (HSP26) 和原肌球蛋白。下调的蛋白质包括 3 种与蛋白平衡有关的蛋白质、3 种代谢酶和 2 种与细胞骨架有关的蛋白质 (Li and Denlinger, 2010)。类似的实验表明, 在稻水象甲的 RCH 过程中, 有 21 种蛋白质上调表达, 8 种下调表达。在上调的蛋白质中有两个小分子热激蛋白, 几个代谢酶和几个与细胞骨架

有关的蛋白质 (Yang *et al.*, 2018)。但是, 在黑腹果蝇中, 当蛋白质合成被环己酰亚胺阻断时, 果蝇仍然能够产生 RCH 现象 (Misener *et al.*, 2001), 因此蛋白质合成似乎并不是 RCH 的必要因素。

3.2.3 细胞信号和翻译后修饰 RCH 的机制还包括某些细胞信号调控, 如调节钙信号与平衡钾离子浓度。钙离子水平与温度密切相关, 诱导 RCH 过程中通常伴随着细胞内钙离子浓度的增加, 因此细胞可能通过钙离子来感知温度并相应地调整细胞的生理状态 (Teets *et al.*, 2008)。钙离子螯合、阻断钙离子通道都可以抑制细胞中的 RCH 现象 (Teets *et al.*, 2013), 这些实验证明驯化过程中钙离子内流能促进 RCH 现象的产生。除钙信号外, RCH 还能调节钾离子稳态。目前的研究表明, 低温诱导细胞膜去极化并导致高钾血症, 进而导致冷伤害 (Overgaard and MacMillan, 2017)。在黑腹果蝇的大脑中, 冷胁迫使得细胞外钾离子浓度急剧升高, RCH 则使昆虫在恢复期间可以更快地清除钾离子以降低钾离子浓度 (Armstrong *et al.*, 2012)。在东亚飞蝗中也观察到了几乎相同的结果, 即 RCH 加快了低温胁迫后钾离子稳态的恢复 (Findsen *et al.*, 2013)。

RCH 还伴随着 p38MAPK 的磷酸化 (Fujiwara and Denlinger, 2007; Li *et al.*, 2012)。在 0 °C 冷冻几分钟后, 可在昆虫体内检测到了 p38MAPK 的磷酸化, 并且发现在其它几个对 RCH 诱导效果更好的温度下磷酸化反应更强烈 (Fujiwara and Denlinger, 2007)。有研究报道 RCH 可以抑制冷休克后的细胞凋亡, 而细胞凋亡信号是 p38MAPK 在胁迫过程中的一个潜在靶标, 这间接表明 RCH 可能促进了 p38MAPK 的磷酸化 (Yi and Lee, 2011)。Overgaard 等 (2014) 还观察到 RCH 过程中糖原磷酸化酶的明显磷酸化, 同时伴随着葡萄糖水平的轻微上升。RCH 过程涉及的转录变化与蛋白质合成相对较少, 这表明 RCH 在很大程度上受到细胞信号的调控, 可以说细胞信号与转录后修饰是 RCH 的重要机制。

4 快速冷耐受的生态意义

快速冷耐受现象广泛存在于多种生物中。在昆虫纲的鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、直翅目和缨尾目都观察到了这种现象 (Lee and Denlinger, 2010; Owen *et al.*, 2013)。此外, RCH 也存在于其他动物中, 包括火蜥蜴 (Layne and Claussen, 1987)、鱼类 (Hazel and Landrey, 1988)、蜉蝣 (Broufas and Koveos, 2001)、海龟 (Muir *et al.*, 2010) 和甲壳类 (Ronges *et al.*, 2012) 等。可以推测, 耐寒能力的快速可塑性是变温动物的一个普遍特征。

环境温度的急剧下降对于没有滞育、休眠等越冬策略的昆虫来说是致命的, 对于这些昆虫, RCH 就显得格外重要, 例如帝王蝶 *Danaus plexippus* L. 在越冬迁飞过程中, 常常遭遇低温和霜冻天气, 而 RCH 则使得越冬的帝王蝶能够应对这种温度的突然变化 (Larsen and Lee, 1994)。昆虫的 RCH 还具有环境适应性。Chen 等 (1990) 在比较了几个来自不同纬度和海拔的果蝇的 RCH 反应后发现, 温带种群的冷驯化效应明显比其他种群更强烈。因为较热带而言, 温带的气温波动更为频繁, 因此可以推测, RCH 是昆虫在自然环境中应对温度变化的重要手段之一。

昆虫快速冷耐受现象的研究对许多领域都具有重要性, 如农业害虫的越冬存活率预测, 温室、仓储、卫生及一些检疫害虫的综合控制, 实验昆虫、有益昆虫的冷冻保存等。此外, 近年来全球气候变暖加剧, 不仅使地球平均温度持续上升, 还导致气温的异常波动, 尤其是在早春和晚秋, 忽冷忽热的天气频繁出现, RCH 对昆虫种群生存的重要性日益凸显。因此, 无论从理论探讨, 还是实践应用来说, 开展 RCH 相关的研究工作相当重要 (Lee, 1987; 王宪辉等, 2003; 杨友福, 2018)。

5 研究展望

从快速冷耐受的首次发现至今已有约 30 年时间, 多年的研究让人们对于 RCH 这一现象有了

一定的了解,但目前对 RCH 机制的研究仍不全面。虽然已经发现了一些重要的上游调控因子(钙信号转导, p38MAPK 等),但下游调控过程仍亟待进一步研究。

目前有关 RCH 的研究大多都是将研究对象骤然转移到驯化温度下,只有极少数的研究在诱导 RCH 时采用了缓慢降温的处理方法(Kelty and Lee, 1999; Wang and Kang, 2003; Overgaard and Sørensen, 2008)。这提醒我们在今后的快速冷耐受研究中应当模拟自然条件,包括缓慢降温或设置温度周期循环,这样才能更好地分析在自然环境下 RCH 的生态意义。

另外,除了低温处理,紫外线暴露、高温处理、饥饿、缺水等逆境胁迫也能诱导快速冷耐受现象(Yoder *et al.*, 2006; Gantz and Lee, 2015; Cutler and Guedes, 2017),然而目前大多数关于 RCH 的研究都是只考虑了单一胁迫的情况;同时使用多种胁迫交叉处理将有利于加强我们对 RCH 的生态相关性及其机制的理解。

参考文献 (References)

- Ahn JJ, Choi K, Huang SY, Al Baki MA, Ahmed S, Kim Y, 2018. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, and its association with rapid cold hardiness. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 21(4): 1275–1282.
- Andersen JL, Findsen A, Overgaard J, 2013. Feeding impairs chill coma recovery in the migratory locust (*Locusta: Migratoria*). *Journal of Insect Physiology*, 59(10): 1041–1048.
- Armstrong GAB, Rodriguez EC, Robertson RM, 2012. Cold hardening modulates K⁺ homeostasis in the brain of *Drosophila melanogaster* during chill coma. *Journal of Insect Physiology*, 58(11): 1511–1516.
- Bale JS, 1996. Insect cold hardiness: A matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93(3): 369–382.
- Broufas GD, Koveos DS, 2001. Rapid cold hardening in the predatory mite *Euseius (Amblyseius) finlandicus* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Insect Physiology*, 47(7): 699–708.
- Chang YW, Zhang XX, Lu MX, Du YZ, Zhu-Salzman KY, 2019. Molecular cloning and characterization of small heat shock protein genes in the invasive leaf miner fly, *Liriomyza trifolii*. *Genes*, 10(10): 110–123.
- Chang YW, Zhang XX, Lu MX, Gong WR, Du YZ, 2020. Transcriptome analysis of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in response to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 34: 1000677.
- Chen CP, Denlinger DL, Lee RE, 1987. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Zoology*, 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. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160(5): 543–547.
- Coulson SJ, Bale JS, 1990. Characterizations and limitations of the rapid cold-hardening response in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Insect Physiology*, 36(3): 207–211.
- Cutler GC, Guedes RNC, 2017. Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects//Duke SO, Kudsk P, Solomon K(eds.). *Pesticide Dose: Effects on the Environment and Target and Non-Target Organisms*. Washington, DC: American Chemical Society. 101–119.
- Everman ER, Delzeit JL, Hunter FK, Gleason JM, Morgan TJ, 2018. Costs of cold acclimation on survival and reproductive behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 13(5): e0197822.
- Feng CJ, Lv WJ, Dong QA, Chen J, Fu WJ, 2007. Effect of low temperature treatment on larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Ecologica Sinica*, 50(1): 1–6. [冯从经, 吕文静, 董秋安, 陈俊, 符文俊, 2007. 低温处理对亚洲玉米螟幼虫抗寒性的诱导效应. 昆虫学报, 50(1): 1–6]
- Findsen A, Andersen JL, Calderon S, Overgaard J, 2013. Rapid cold hardening improves recovery of ion homeostasis and chill coma recovery time in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Experimental Biology*, 216(9): 1630–1637.
- 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*. *Journal of Experimental Biology*, 210(18): 3295–3300.
- Gantz JD, Lee RE, 2015. The limits of drought-induced rapid cold hardening: Extremely brief, mild desiccation triggers enhanced freeze-tolerance in *Eurosta solidaginis* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 73: 30–36.
- Hazel JR, Landrey SR, 1988. Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kindey. II. Molecular-species composition. *American Journal of Physiology*, 255(4): R628–R634.
- Jakobs R, Garipey TD, Sinclair BJ, 2015. Adult plasticity of cold

- tolerance in a continental-temperate population of *Drosophila suzukii*. *Journal of Insect Physiology*, 79: 1–9.
- Katherinea M, Arya H, 2010. Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Functional Ecology*, 24(3): 694–700.
- Kawarasaki Y, Teets NM, Denlinger DL, Lee RE, 2013. The protective effect of rapid cold-hardening develops more quickly in frozen versus supercooled larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Experimental Biology*, 216(20): 3937–3945.
- Kelty J, 2007. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* in a field setting. *Physiological Entomology*, 32(4): 343–350.
- Kelty JD, Lee RE, 1999. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 45(8): 719.
- Khodayari S, Moharramipour S, Kamali K, Javaran MJ, Renault D, 2012. Effects of acclimation and diapause on the thermal tolerance of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Thermal Biology*, 37(6): 419–423.
- Kim Y, Namho K, 1997. Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environment Entomology*, 26(5): 1117.
- Kim Y, Lee DW, Jung JK, 2017. Rapid cold-hardening of a subtropical species, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae), accompanies hyper trehalose mia by upregulating trehalose-6-phosphate synthase. *Environmental Entomology*, 4(6): 1432–1438.
- Kostal V, 2010. Cell structural modifications in insects at low temperatures//Denlinger DL, Lee RE(eds.). *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge: Cambridge University Press. 116–140.
- Koveos DS, 2001. Rapid cold hardening in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3): 257–263.
- Larsen KJ, Lee RE, 1994. Cold tolerance including rapid cold-hardening and inoculative freezing of fall migrant monarch butterflies in Ohio. *Journal of Insect Physiology*, 40(10): 859–864.
- Layne JR, Claussen DL, 1987. Time courses of thermal acclimation for critical thermal minima in the salamanders *Desmognathus quadramaculatus*, *Desmognathus monticola*, *Desmognathus ochrophaeus*, and *Plethodon jordani*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87(4): 895–898.
- Le Bourg E, 2013. Fasting can protect young and middle-aged *Drosophila melanogaster* flies against a severe cold stress. *Biogerontology*, 14(5): 513–529.
- Lee RE, Damodaran K, Yi SX, Lorigan GA, 2006. Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology*, 52(4): 459–463.
- Lee RE, Denlinger DL, 2010. Rapid cold-hardening: Ecological significance and underpinning mechanisms//Denlinger DL, Lee RE(eds.). *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge: Cambridge University Press. 35–58.
- Lee RE, Denlinger DL, 2015. Stress tolerance in a polyextremophile: the southernmost insect. *Canadian Journal of Zoology*, 93(9): 679–686.
- Lee RE, Richard E, Chen CP, Denlinger DL, 1987. A rapid cold hardening process in insects. *Science*, 238 (4832): 1415.
- Li AQ, Denlinger DL, 2010. Rapid cold hardening elicits changes in brain protein profiles of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Molecular Biology*, 17(5): 565–572.
- Li FF, Xia J, Li JM, Liu SS, Wang XW, 2012. p38 MAPK is a component of the signal transduction pathway triggering cold stress response in the MED cryptic species of *Bemisia tabaci*. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 303–311.
- Li HB, Shi L, Wang JJ, Du YZ, 2011. Rapid cold hardening of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its ecological cost. *Acta Ecologica Sinica*, 31(23): 7196–7202. [李鸿波, 史亮, 王建军, 2011. 西花蓟马的快速冷驯化及其生态学代价. *生态学报*, 31(23): 7196–7202.]
- Lu MX, Li HB, Zheng YT, Shi L, Du YZ, 2016. Identification, genomic organization and expression profiles of four heat shock protein genes in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Thermal Biology*, 57(6): 110–118.
- MacMillan HA, Guglielmo CG, Sinclair BJ, 2009. Membrane remodeling and glucose in *Drosophila melanogaster*: A test of rapid cold-hardening and chilling tolerance hypotheses. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 243–249.
- Michaud MR, Denlinger DL, 2006. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 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. *Journal of Comparative Physiology*, 177(7): 753–763.
- Misener SR, Chen CP, Walker VK, 2001. Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 47(4): 393–400.
- Muir TJ, Costanzo JP, Lee RE, 2010. Brief chilling to subzero

- temperature increases cold hardiness in the hatchling painted turtle (*Chrysemys picta*). *Physiological Biochemical Zoology*, 83(1): 174–181.
- Nyamukondiwa C, Terblanche JS, Marshall KE, Sinclair BJ, 2011. Basal cold but not heat tolerance constrains plasticity among *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae). *Evolutionary Biology*, 24(9): 1927–1938.
- Overgaard J, MacMillan HA, 2017. The integrative physiology of insect chill tolerance. *Annual Review of Physiology*, 79: 187–208.
- Overgaard J, Malmendal A, Sørensen JG, Bundy JG, Loeschke V, Nielsen NC, Holmstrup M, 2007. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 53(12): 1218–1232.
- Overgaard J, Sørensen JG, 2008. Rapid thermal adaptation during field temperature variations in *Drosophila melanogaster*. *Cryobiology*, 56(2): 159–162.
- Overgaard J, Sørensen JG, Colinet H, 2014. The rapid cold hardening response of *Drosophila melanogaster*: Complex regulation across different levels of biological organization. *Journal of Insect Physiology*, 62: 46–53.
- Overgaard J, Sørensen JG, Petersen SO, 2006. Reorganization of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Entomology*, 31(4): 328–335.
- Overgaard J, Sørensen JG, Petersen SO, Loeschke V, Holmstrup M, 2005. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 51(11): 1173–1182.
- Owen EL, Bale JS, Hayward SAL, 2013. Can winter-active bumblebees survive the cold? Assessing the cold tolerance of *Bombus terrestris audax* and the effects of pollen feeding. *PLoS ONE*, 8: e80061.
- Qiang C, Du YZ, Yu LY, Cui YD, Zheng FS, Lu MX, 2008. Effect of rapid cold hardening on the cold tolerance of the larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *Agricultural Sciences in China*, 7(3): 321–328.
- Qin W, Neal SJ, Robertson RM, Westwood JT, Walker VK, 2005. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insects Molecular Biology*, 14(6): 607–613.
- Park Y, Kim Y, 2014. A specific glycerol kinase induces rapid cold hardening of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Physiology*, 67(6): 56–63.
- Rako L, Hoffmann AA, 2006. Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 52(1): 94–104.
- Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL, 2000. Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Entomology*, 25(4): 330–336.
- Ronges D, Walsh JP, Sinclair BJ, Stillman JH, 2012. Changes in extreme cold tolerance, membrane composition and cardiac transcriptome during the first day of thermal acclimation in the porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. *Journal of Experimental Biology*, 215 (11): 1824–1836.
- Salt RW, 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6: 55.
- Sinclair BJ, Chown SL, 2003. Rapid responses to high temperature and desiccation but not to low temperature in the freeze tolerant sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Insect Physiology*, 49(1): 45–52.
- Sinclair BJ, Coello Alvarado LE, Ferguson LV, 2015. An invitation to measure insect cold tolerance: Methods, approaches, and workflow. *Journal of Thermal Biology*, 53: 180–197.
- Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP, 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 16(4): 435–443.
- Sinensky M, 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(2): 522–525.
- Srithiphaphirom P, Lavallee S, Robertson RM, 2019. Rapid cold hardening and octopamine modulate chill tolerance in *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 234(2): 28–35.
- Teets NM, Denlinger DL, 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiological Entomology*, 38(2): 105–116.
- Teets NM, Elnitsky MA, Benoit JB, Lopez-Martinez G, Denlinger DL, Lee RE, 2008. Rapid cold-hardening in larvae of the Antarctic midge *Belgica antarctica*: Cellular cold-sensing and a role for calcium. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2): R1938–R1946.
- Teets NM, Gantz JD, Kawarasaki Y, 2020. Rapid cold hardening: Ecological relevance, physiological mechanisms and new perspectives. *Journal of Experimental Biology*, 223(3): jeb203448.
- Teets NM, Kawarasaki Y, Potts LJ, Philip BN, Gantz JD, Denlinger DL, Lee RE, 2019. Rapid cold hardening protects against sublethal freezing injury in an Antarctic insect. *Journal of*

- Experimental Biology*, 222(15): jeb206011.
- Teets NM, Peyton JT, Ragland GJ, Colinet H, Renault D, Hahn DA, Denlinger DL, 2012. Combined transcriptomic and metabolomic approach uncovers molecular mechanisms of cold tolerance in a temperate flesh fly. *Physiological Genomics*, 44(15): 764–777.
- Teets NM, Yi SX, Lee RE, Denlinger DL, 2013. Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22): 9154–9159.
- Vesala L, Salminen TS, Laiho A, Hoikkala A, Kankare M, 2012. Cold tolerance and cold-induced modulation of gene expression in two *Drosophila virilis* group species with different distributions. *Insect Molecular Biology*, 21(1): 107–118.
- Walters KF, Bale JS, McDonald JR, 1997. Rapid cold hardening in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 43(8): 759.
- Wang XH, Kang L, 2003. Rapid cold hardening in young hoppers of the migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridiidae). *Cryo Letter*, 24(5): 331.
- Wang XH, Qi XL, Kang L, 2003. Rapid cold acclimation of insects and its ecological adaptation significance. *Progress in Natural Science*, 13(11): 1128–1133. [王宪辉, 齐宪磊, 康乐, 2003. 昆虫的快速冷驯化现象及其生态适应意义. 自然科学进展, 13(11): 1128–1133.]
- Yang S, Zhang X, Wang J, Wang S, Pan Y, Zhang J, Xi J, 2018. Identification and analysis of up-regulated proteins in *Lissorhoptus oryzophilus* adults for rapid cold hardening. *Gene*, 642(5): 9–15.
- Yang YF, 2018. Study on physiology responses and fitness of offsprings to rapid cold hardening of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agriculture University. [杨友福, 2018. 异色瓢虫对快速冷驯化的生理响应及后代适合度研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- 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.
- Yoder JA, Benoit JB, Denlinger DL, Rivers DB, 2006. Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: Evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 202–214.
- Zheng X, Zhou L, Lu W, Xian Z, Yang Z, Lei CL, Wang XP, 2014. Cold-hardiness mechanisms in third instar larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *African Entomology*, 22(4): 863–871.