

ПОТЕНЦИАЛ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ ЛЕТНИХ НАСЕКОМЫХ НА ПРИМЕРЕ *UPIS CERAMBOIDES* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE), ОБИТАЮЩЕГО В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

Н.Г. Ли

[Li N.G. Cold hardiness potential of the *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae) as a model of summer insects inhabiting Yakutia]

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, пр. Ленина, 41, г. Якутск, Республика Саха (Якутия), 677980, Россия. E-mail: li_natalia@mail.ru

Institute for biological problems of cryolithozone SD RAS, Lenin avenue, 41, Yakutsk, Republic Sakha (Yakutia), 677980, Russia. E-mail: li_natalia@mail.ru

Ключевые слова: *Upis ceramboides*, Coleoptera, Tenebrionidae, потенциал холодоустойчивости, Якутия

Key words: *Upis ceramboides*, Coleoptera, Tenebrionidae, cold hardiness potential, Yakutia

Резюме. На примере имаго *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae), обитающего в Якутии, показано, что летние насекомые могут быть устойчивыми к многократным циклам замораживания – оттаивания при температуре их переохлаждения, а также после инкубирования при +4°C в течение 14 дней они могут быть устойчивы к температурам ниже –15°C. В соответствии с данным исследованием одной из причин повышения устойчивости к таким температурам является глубокое очищение организма насекомых от случайных нуклеаторов льда, входящих в состав пищевых остатков в кишечнике, происходящее в ходе холодовой закалки. На фоне этого процесса происходит демаскировка эндогенных лед-нуклеирующих структур адаптивного типа, которые, по-видимому, и обуславливают устойчивость данного вида к отрицательным температурам в летний период. Выказано предположение, что в случае летних заморозков устойчивость насекомых к отрицательным температурам формируется за счет очищения организма от случайных лед-нуклеаторов, присутствующих в кишечнике.

Summary. Ability of *Upis ceramboides* imago was studied to be resisted to the different ranges of freezing temperatures during hot summer period in Yakutia. It was shown that *Upis ceramboides* are tolerant to multiply cycles of freezing-thawing at their SCP (supercooling point) and even more, they survived over at least three cycles of freezing-thawing at –15...–17°C, if they were pre-incubated during 14 days at +4°C before laboratory testing. According to the study, one of the reasons of elevating of the insect resistance to such temperature conditions is a deep cleansing of body from occasional ice nucleators appearing in the intestine. It is suggested that in the case of summer frost, the cold tolerance of these species would be based on gut clearing.

ВВЕДЕНИЕ

Основная научная терминология, использованная в статье

Стратегия морозоустойчивости (freeze-tolerance) – образование внутриклеточного льда предотвращается путем повышения температуры замерзания. Это достигается посредством специфических лед-нуклеирующих агентов, обеспечивающих контролируемое внеклеточное лед-образование (как правило, в гемолимфе) при температурах выше температуры кристаллизации внутриклеточной воды. Благодаря этому процессу насекомые не погибают при замерзании [Ramlov, 2000; Kristiansen et al., 2009].

Стратегия морозочувствительности (freeze-avoiding) – предотвращение кристаллизации воды в организме путем значительного переохлаждения. При этом удаляются все нуклеирующие агенты, которые способны вызвать спонтанное лед-образование, вырабатываются значительные концентрации полиолов, главным образом, глицерин, что понижает температуру их замерзания и продуцируются антифризные белки, которые стабилизируют переохлажденное состояние [Ramlov, 2000; Kristiansen et al., 2009].

Температура переохлаждения (supercooling point) – температура, при которой происходит кристаллизация воды.

Лед-нуклеирующие белки (ice-nucleating proteins) – это специфические вещества адаптивного характера, инициирующие контролируемое лед-образование в гемолимфе насекомых до того, как лед мог бы образоваться во внутриклеточных структурах. Существуют также неспецифические лед-нуклеирующие агенты, которые, как правило, локализируются в кишечнике питающихся насекомых [Zachariassen, 1985].

Специфическая лед-нуклеирующая активность (specific ice-nucleating activity) – это величина «плато», область высоких концентраций лед-нуклеаторов, в пределах которых лед-нуклеирующая активность меняется очень незначительно при разбавлении образца гемолимфы [Zachariassen, 1992]. Количественно специфическая лед-нуклеирующая активность может быть выражена как соотношение величины температуры замерзания насекомого к тотальной концентрации белка в гемолимфе [Ли, 2011].

Как известно, холодоустойчивость организма формируется в результате ряда метаболических перестроек, происходящих в клетках под влиянием сезонно меняющегося фотопериода, а также температуры окружающей среды. У насекомых, устойчивых к замерзанию (не погибают при замерзании), происходит биосинтез эндогенных лед-нуклеирующих белков, контролирующих безопасное лед-образование в организме в области субнулевых тем-

ператур ($-7 \dots -12^\circ\text{C}$), а также продукция полиолов. У насекомых, чувствительных к замерзанию (погибают, если лед образуется в их организме), развивается способность к глубокому переохлаждению за счет биосинтеза антифризных белков, а также мультимольярных концентраций полиолов [Zachariassen, 1985; Block, 1990; Duman, 1991].

В литературе по холодоустойчивости насекомых существует довольно прочно утвердившееся представление о том, что летние насекомые, как правило, теряют холодоустойчивость, присущую им в зимний период. Это связано с тем, что метаболизм летних насекомых служит выполнению качественно иных функций, он характеризуется высокой активностью, при которой аккумуляция веществ, осуществляющих криопротекцию, в значительных количествах практически невозможно. Действительно, как показали многочисленные исследования, концентрация основных метаболитов, ответственных за устойчивость к низким температурам, значительно снижается в летний период или вообще становится равной нулю [Baust, Miller, 1970; Baust, Rojas, 1985; Margesin, Schinner, 1999; Michaud, 2007; Ли, 2011].

В современной литературе в основном приведены данные по изучению холодоустойчивости зимних насекомых и практически очень мало информации о том, что происходит с этим качеством в летний период. В ранних исследованиях было показано, что жуки, обитающие в горах Кении, где суточная температура варьирует от $+10^\circ\text{C}$ днем до -10°C ночью, комбинируют дневную активность, включающую питание, и холодовую экспозицию ночью. У этих жуков была зарегистрирована высокая температура переохлаждения, указывающая на присутствие активных лед-нуклеирующих агентов эндогенной природы (как правило, локализируются в гемолимфе). Поскольку жуки питаются, они содержат остатки пищи в кишечнике, являющимися потенциальными агентами, провоцирующими спонтанное повреждающее замерзание, приводящее к гибели насекомых. По предположению авторов, благодаря наличию эндогенных лед-нуклеаторов, несущих адаптивную функцию, инициация замерзания происходит до того, как летальное замерзание могло бы случиться в кишечнике [Somme, Zachariassen, 1981]. Аналогичные данные были получены Лааком при изучении сезонных аспектов холодоустойчивости жука *Phylloocta laticollis*, обитающего в Норвегии [Sidsel van der Laak, 1982].

Имеются также сообщения о насекомых, обитающих в южном полушарии (области выше 30° широты), которые в летний период являются устойчивыми к замерзанию [Sinclair, 2003]. Климат в этих регионах считается мягким, но характеризуется в течение всего года непредсказуемыми температурными изменениями, с переходами от положительных к субнулевым значениям и наоборот. Эти насекомые используют стратегию устойчивости к замерзанию для того, чтобы противостоять таким нестабильным климатическим условиям. Одним из объяснений их то-

лерантности к замерзанию в летний период является наличие нуклеаторов льда в содержимом кишечника в момент замерзания, которые в условиях мягкого климата выступают в качестве экзогенных агентов, предотвращающих фатальное замерзание всего организма. По этой причине стратегия морозоустойчивости у насекомых является, вероятно, доминирующей в таких регионах [Sinclair, 2003].

Таким образом, результаты описанных исследований показывают неоднозначность существующих представлений о механизмах холодоустойчивости насекомых в летний период. Прежде всего, непонятна роль кишечных нуклеаторов льда в отношении их устойчивости к замерзанию.

Насекомые Якутии характеризуются экстраординарной холодоустойчивостью, позволяющей им быть устойчивыми к низким и очень низким температурам, а также к пролонгированному воздействию экстремального холода [Ли, 2012]. Как было показано в исследованиях, в зимний период насекомые накапливают значительные количества белков, полиолов, других соединений, которые повышают осмоляльность гемолимфы [Ли, 2011]. У морозоустойчивых видов комбинированное действие таких веществ, как полиолы и лед-нуклеирующие белки является наиболее важным, возможно, критическим физико-химическим фактором, обуславливающим высокую степень их холодоустойчивости. Известно, что содержание полиолов значительно понижается весной и практически исчезает вовсе в летний период, а количество лед-нуклеирующих белков становится следовым. Соответственно, насекомые катастрофически теряют устойчивость к низким отрицательным температурам [Ли, 2011; Ли, 2012]. Однако при этом неизвестно, исчерпывается ли полностью потенциал холодоустойчивости у этих насекомых в летний период, способны ли они, например, противостоять внезапным заморозкам, которые иногда имеют место в Якутии?

Для изучения этого вопроса в настоящей работе были впервые проведены исследования по изучению потенциала холодоустойчивости насекомых Якутии в летний период на примере *Upis ceramboides* (Linnaeus, 1758), представителя семейства Tenebrionidae (Coleoptera). Климат в Якутии отличается резко континентальным характером и отличается очень низкими зимними и высокими летними температурами воздуха [Гаврилова, 2003].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследований

В исследовании были использованы жуки *Upis ceramboides*, в стадии имаго, собранные в березовом лесу, в окрестностях г. Якутска в июле 2011-2012 г.г. Жуки извлекались с помощью пинцета из-под коры деревьев, где они неподвижно локализовались единично или группами.

Измерение температуры переохлаждения

Температуру переохлаждения насекомых в диапазоне $0 \dots -20^\circ\text{C}$ измеряли с помощью термо-

пары, соединенной с самописцем. При этом конец термопары был плотно прижат к телу насекомого. Температуру переохлаждения определяли по экзотермическому эффекту, сопровождающему переход гемолимфы насекомого из жидкого состояния в твердое. Если после оттаивания насекомые сохраняли способность к дыханию, координированному передвижению, то их относили к насекомым, устойчивым к замерзанию [Sidsel van der Laak, 1982]. Температура переохлаждения в результатах представлена как среднее значение и его стандартное отклонение.

Определение концентрации белка в гемолимфе

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [Jones et al., 2003].

Перед измерениями образцы зимней гемолимфы разводили физиологическим раствором в 20 раз, летней – в 5 раз.

Специфическая лед-нуклеирующая активность

Для определения лед-нуклеирующей активности гемолимфу зимних насекомых, объемом 0,25 мкл, вводили с помощью специально изготовленного для этих целей микрошприца в 5 мкл физиологического раствора NaCl внутрь тонкого стеклянного капилляра. Полученный образец медленно охлаждали со скоростью 1°C/мин до тех пор, пока тепло, высвобождаемое при кристаллизации раствора, не было зарегистрировано в виде температуры замерзания образца [Zachariassen et al., 1982].

В раннем исследовании было показано, что лед-нуклеирующая активность гемолимфы зависит от концентрации белка. Поэтому в данной работе специфическая лед-нуклеирующая активность выражена как соотношение температуры переохлаждения к общей концентрации белка в гемолимфе [Ли, 2011].

Определение осмоляльности гемолимфы

Осмоляльность гемолимфы насекомых определяли по значению температуры плавления с помощью нанолитр осмометр ("Otago osmometers", New Zealand). Прибор приспособлен для работы с 5нл образца. 5нл нативной гемолимфы, полученной капиллярным методом, наносили на поверхность пор измерительной ячейки, которые предварительно загружали минеральным маслом. Ячейку охлаждали до момента замерзания образца, после чего его медленно отогревали. Температура, при которой последний самый маленький кристалл исчезал, и есть температура плавления.

Определение содержания воды в теле насекомых

Чтобы определить относительное содержание воды, насекомых высушивали до постоянного веса при температуре +40°C. При данной температуре испарения глицерина не происходит.

Тестирование насекомых на толерантность к температуре замерзания

В исследовании было использовано 28 жуков *U. ceramoides*, которые были распределены по

4 группам насекомых, подвергающихся воздействию температурного стресса:

1 группа (8 особей): свежие, питающиеся насекомые, собранные незадолго до начала эксперимента, подвергались процедуре измерения температуры переохлаждения без предварительной закалки (режим «с нуклеаторами»);

2 группа (4 особи): насекомые (с содержимым в кишечнике), подвергающиеся многократным циклам замораживания-оттаивания (3 цикла) при температуре их переохлаждения. Для этой цели насекомые подвергались замораживанию со скоростью 1°C/мин до точки их замерзания, а затем примерно с такой же скоростью оттаивали до комнатной температуры (режим «с нуклеаторами I»);

3 группа (8 особей): насекомые, находившиеся в течение 5 дней при температуре +4°C в холодильной камере без питания, замораживались со скоростью 1°C/мин до –13°C (режим «без нуклеаторов I»);

4 группа (8 особей): насекомые, находившиеся в течение 14 дней при температуре +4°C в холодильной камере без питания, замораживались со скоростью 1°C/мин до –15°C (режим «без нуклеаторов II»).

После каждого этапа замораживания насекомые тестировались на их способность самостоятельно передвигаться в пространстве площадью 150 см².

Выбор режима замораживания (1°C/мин) был связан с тем, что он близок к природным условиям замерзания насекомых, когда они находятся в своих естественных укрытиях.

Статистические методы

Сравнение средних значений между образцами было сделано с помощью статистического пакета Статистика 6.0 с использованием программы ANOVA/ Tukey's. Величины представлены как среднее значение со стандартным отклонением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические свойства гемолимфы летних и зимних жуков *U. ceramoides* характеризуются существенными отличиями. У летних жуков значительно ниже концентрация осмолитов, белков и выше содержание воды. Они также характеризуются более высокой температурой переохлаждения и низкой специфической активностью эндогенных лед-нуклеаторов (табл. 1). Это позволяет предполагать, что в летний период жуки не являются устойчивыми к замерзанию. Действительно, проведенные мною ранее измерения на единичных особях (два жука были протестированы в разные периоды времени в течение лета) подтверждали данное предположение; при замораживании жуков до температуры их переохлаждения они погибали. Однако более детальные исследования, проведенные на более значительной выборке (8 жуков), явно продемонстрировали устойчивость летних насекомых к температурам, лежащим в области их температур

Некоторые физиологические параметры гемолимфы *Upis ceramoides* по сезонам

Сезон	Физиологические параметры гемолимфы <i>Upis ceramoides</i>				
	Температура переохлаждения, °С	Осмоляльность, mOsmol	Концентрация белка, мг/мл	Специфическая лед-нуклеирующая активность, °С/мг	Содержание воды, %
Зима (n=6)	-10,5 ± 1,2	550 ± 25	117 ± 19	-0,09 ± 0,2	49,0 ± 3,5
Лето (n=8)	-7,7 ± 0,2	150 ± 14	45 ± 21	-0,17 ± 0,15	68,6 ± 5,3

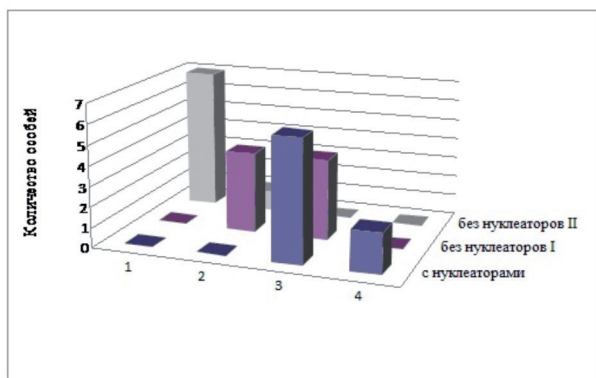


Рис. 1. Влияние нуклеаторов льда в кишечнике летних жуков *U. ceramoides* на их выживаемость при замораживании до -13°C : 1 – активные; 2 – умеренно активные; 3 – пассивные; 4 – погибшие

Fig. 1. The influence of gut nucleators in the summer specimens *U. ceramoides* their survival during freezing at -13°C : 1 – active; 2 – moderate; 3 – passive; 4 – died

переохлаждения, а также к более низкой температуре $-17,5^{\circ}\text{C}$.

Для выявления факторов, влияющих на холододовую резистентность, летние жуки тестировались на устойчивость к 4 температурным режимам, описанным в материалах и методах.

Полученные результаты показали, что внезапное замораживание питающихся жуков («группа 1»), имеющих содержимое в кишечнике до -13°C , приводило к их существенному повреждению, что проявлялось в очень медленной реактивации и гибели некоторых из них (рис. 1). Данная группа насекомых не выдерживала повторного замораживания при $-12,5^{\circ}\text{C}$ и замораживания при -15°C (рис. 2, режим «с нуклеаторами»).

Все исследованные насекомые «группы 2» были довольно устойчивыми к многократным циклам замораживания-оттаивания при температуре их замерзания (выдерживают, по меньшей мере, 3 цикла).

Если насекомых выдержать в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$, то их реактивация после замораживания при $-13...-15,0^{\circ}\text{C}$ происходила быстрее, чем в «группе 1». Жуки проявляли признаки жизни даже после замораживания при $-17,5^{\circ}\text{C}$.

Жуки «группы 3», находившиеся в течение 5 дней при $+4^{\circ}\text{C}$, существенно лучше активировались после замерзания при температуре -13°C , хотя эффективность их реактивации снижалась после замораживания при -15°C (рис. 1, 2).

Наконец, жуки «группы 4», находившиеся при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель, успешно реактиви-

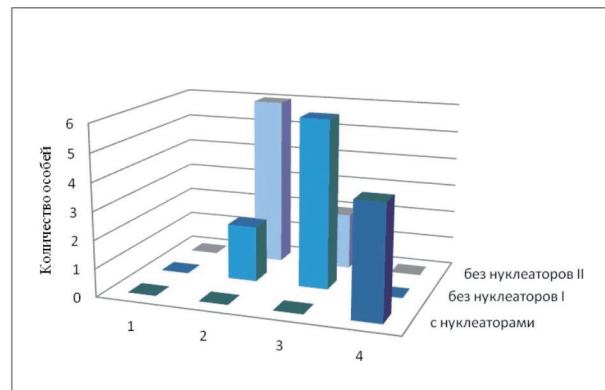


Рис. 2. Влияние нуклеаторов льда в кишечнике летних жуков *U. ceramoides* на их выживаемость при замораживании до -15°C : 1 – активные; 2 – умеренно активные; 3 – пассивные; 4 – погибшие

Fig. 2. The influence of gut nucleators in the summer specimens *U. ceramoides* their survival during freezing at -15°C : 1 – active; 2 – moderate; 3 – passive; 4 – died

ровались после замораживания при $-13,0^{\circ}\text{C}$; эта способность понижалась после их замораживания при -15°C , что выражалось в отсутствии активных и увеличении слабо активных особей (рис. 2). Но наиболее примечательным было то, что насекомые, толерантные к -15°C , выдерживали последующее замораживание при $-17,5^{\circ}\text{C}$ с сохранением способности к самостоятельному передвижению, т.е. они были толерантны, по меньшей мере, к двухкратному циклу замораживания-оттаивания в диапазоне $-15...-17^{\circ}\text{C}$.

Таким образом, в соответствии с полученными в данном исследовании результатами, очевидно, что кишечные нуклеаторы понижают устойчивость летних насекомых к отрицательным температурам. Инкубирование насекомых при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 дней без питания приводило к увеличению степени резистентности жуков к температурам ниже -13°C . Пролонгирование времени холодной закали до 14 дней еще более повышало степень холодоустойчивости этих насекомых. Маловероятно, что устойчивость к отрицательным температурам явилась результатом существенных физико-химических изменений в гемолимфе под влиянием низких положительных температур ($+4^{\circ}\text{C}$), т.к. насекомые оказались в этих условиях внезапно, без предварительной подготовки, и отсутствие питания не позволяло им синтезировать в достаточных количествах вещества, выполняющие криопротекторную или антифризную функцию. Наиболее вероятной причиной повышения холодоустойчивости жуков явилось глубокое очищение организма

ЛИТЕРАТУРА

от случайных нуклеаторов, содержащихся прежде всего в пищевых остатках кишечника, происходившее в течение 5-ти и 14-ти дневной инкубации насекомых при +4°C. Вследствие очищения температура переохлаждения жуков понижалась с -5°C до -7...-9°C, что указывало на повышение потенциала холодоустойчивости. Понижение температуры нуклеации связано с присутствием других лед-нуклеаторов с иной активностью и имеющих эндогенное происхождение. До очищения они были маскированы кишечными нуклеаторами, характеризующимися более высокой температурой нуклеации (-5°C). Наличие в небольших количествах эндогенных лед-нуклеаторов белковой природы в гемолимфе летних жуков *U. ceramboides* было показано ранее [Ли, 2011]. Эти белковые нуклеаторы, вероятно, и обеспечивают их защиту от воздействия более жестких температурных условий (в данном исследовании: -15...-17°C).

Таким образом, активно питающиеся насекомые в летний период довольно чувствительны к отрицательным температурам, что связано с «летним» физико-химическим состоянием их гемолимфы. Нуклеаторы, присутствующие в содержимом кишечника, не способствуют их выживанию, например, при наступлении внезапных заморозков. Напротив, они повышают температуру замерзания насекомых (табл. I) и инициируют неконтролируемое замерзание жидкости в организме, что, как правило, приводит к спонтанному повреждению тканей и органов [Somme, 1982]. Именно по этой причине, насекомые перед уходом на зимовку очищают кишечник [Иванова, 2002].

Каким образом жуки *U. ceramboides* могут выживать при внезапных летних заморозках? Во-первых, понижение температуры окружающей среды происходит постепенно и занимает несколько часов, в течение которых насекомые имеют шанс очистить кишечник и тем самым повысить потенциал холодоустойчивости за счет усиления способности к переохлаждению. При понижении температур окружающей среды до значений ниже температуры их замерзания жуки могут сохранить жизнеспособность благодаря эндогенным лед-нуклеирующим белкам, содержащимся в следовых количествах в их гемолимфе [Ли, 2011]. Как известно, другим очень важным приспособлением является способность насекомых прятаться в укрытиях при наступлении неблагоприятных условий [Li, 2012].

Таким образом, летние насекомые также обладают определенным потенциалом холодоустойчивости, но этот потенциал достигается за счет глубокого очищения организма от случайных нуклеаторов, а также использования имеющихся эндогенных лед-нуклеирующих белков. Учитывая эти факторы, можно прогнозировать, что понижение температур окружающей среды до -17...-20°C не будет являться летальным для исследованных жуков *U. ceramboides* в летний период.

- Гаврилова М.К., 2003 Климаты холодных регионов земли. Якутск. С. 70-87.
- Иванова С.С., 2002. Эколого-биохимические аспекты адаптации зимующих насекомых Якутии к низкотемпературным условиям // дисс ... канд. биол. наук. Улан-Удэ. 142 с.
- Ли Н.Г., 2011. Лед-нуклеирующая активность гемолимфы *Upis ceramboides*, обитающего в Центральной Якутии // Проблемы криобиологии. Т. 21, № 1. С. 34-46.
- Ушатиная Р.С., 1957. Основы холодоустойчивости насекомых. М.: Академия наук СССР. 314 с.
- Baust J.G., Miller L.K., 1970. Seasonal variations in the glycerol content and its influence on cold hardiness in the Alaskan carabid beetle *Pterostichus brevicornis* // J. Insect Physiology. № 16. P. 979-990.
- Baust J.G., Rojas R.R., 2003. Review – insect cold hardiness: facts and fancy // J. Insect Physiol. 1985. V. 31. № 10. P.755-759.
- Jones A., Reed R., Weyers J., 2003. Practical Skills in Biology. UKP. 321 p.
- Kristiansen E., Li N.G., Averensky A.I., Zachariassen K.E., 2009. The Siberian timberman *Acanthocinus aedilis*: a freeze-tolerant beetle with low supercooling points // J Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. V. 179. P. 563-568.
- Lee R.E., Delinger D., 1991. Insects at low temperature. New York : Chapman and Hall. 513 p.
- Li N.G., 2012. Relationships between cold hardiness, and ice nucleating activity, glycerol and protein contents in the hemolymph of caterpillars, *Aporia crataegi* L. // Cryoletters. V. 33(2). P. 134 -142.
- Li N.G., Zachariassen K.E., 2007. Cold hardiness of insects distributed in the area of Siberian Cold Pole // J. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology. V. 146A. P. 156 -157.
- Margesin R., Schinner F., 1999. Cold adopted organisms. Germany: Springer. P. 138.
- Michaud M.R., 2007. Molecular physiology of insect low temperature stress responses // Dissertation. The Ohio State University. 157 p.
- Ramlov H., 2000. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals // Human Reproduction. Vol.15. P. 26-46.
- Sidsel van der Laak, 1982. Physiological adaptations to low temperature in freezing-tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // Comp. Biochem. and Physiol. V. 73A. № 4. P. 613-621.
- Sinclair B., Addo-Bediako A., Chown S.L., 2003. Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance // Biol. Rev. 78. P. 181-195.
- Somme L., 1982. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods // Comp. Biochem. and Physiol. V. 73A. № 4. P. 519-545.
- Somme L., Zachariassen K.E., 1981. Adaptations to low temperature in high latitude insects from Mount Kenya // Ecol. Entomol. № 6. P. 199-204.
- Zachariassen K.E., 1985. Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev. V. 65. P. 799-832.
- Zachariassen K.E., 1992. Ice nucleating agents in cold-hardy insects // Water and Life. Ch. 16. P. 261-281.
- Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.J., 1982. A method for quantitative determination of ice nucleating agents in Insect hemolymph // Cryobiology. Vol. 19. P.180-184.