

TEMPERATURE SMRZAVANJA NEKIH RAZVOJNIH STUPNJEVA DROSOPHILA MELANOGASTER (DIPTERA); ANTHOPHORA PARIETINA I MEGACHILE ROTUNDATA (HYMENOPTERA)

M. D. KRUNIĆ i I. RADOVIĆ (1975)

Institut za Zoologiju, Prirodno-matematički fakultet, Beograd

M. D. Krunić and I. Radović (1975): *Freezing temperatures of some developmental stages of Drosophila melanogaster (Diptera), Anthophora parietina and Megachile rotundata (Hymenoptera)*. — Ekologija, Vol. 10, No. 2, 191—197.

Freezing temperatures (Table 1) are characteristic of each species and their developmental stages, and by application of variational statistics they could be used as a taxonomic character.

All three species are able to overwinter in cold climates, but their developmental stages differ in cold-hardiness. All stages of *D. melanogaster* exhibit high supercooling potential and it seems that there is no particular overwintering stage, while only the prepupal stage is especially cold-hardy in *A. parietina* and *M. rotundata*. In these two species defecation occurs at the time of transformation of the larva into the prepupa, thereby removing nucleators from the gut, with a resultant lowering of the freezing temperature by about 20°C. This is followed by the synthesis of glycerol, which allows even further supercooling, depending on the amount present.

UVOD

Poznat je fenomen smrzavanja vode, a i da se voda pod normalnim uslovima smrzava na 0°C.

Pothlađivanje je stanje pri kome se sprečava smrzavanje. Svi insekti poseduju izvesnu sposobnost pothlađivanja.

Insekti se smrzavaju na dva načina: inokulativnim smrzavanjem, pri čemu led u telo insekta dospeva preko otvora (usni, analni, stigme itd.) i nukleativnim smrzavanjem, pri čemu se stvaranje prvog kristala leda javlja u telu samog insekta, pod dejstvom niskih temperatura i prisutnih nukleatora.

Formiranje prvog kristala leda kod nukleativnog smrzavanja naziva se nukleacija, posle čega nastaje trenutno smrzavanje celog insekta. Nukleacija u kapi vode zavisi od veličine kapi i broja i vrste prisutnih nukleatora (Mason, 1956; Vali, 1968). Identitet i kvalitet nukleatora još uvek

nisu poznati, ali njihovo delovanje je i kod insekata eksperimentalno dokazano (Salt, 1953, 1968; Kaku i Salt, 1968; Krunić, 1971). Iako su izvedeni brojni eksperimenti pomoću kojih se pokušalo odrediti mesto formiranja prvog kristala leda u intaktnih insekata do zaključka, da se nukleacija dešava u crevnom traktu, došlo se indirektnim putem (Salt, 1969; Krunić, 1971).

Pošto je otkriveno da glicerol štiti ćelije od oštećenja koje smrzavanje izaziva (Polge, 1949), nekoliko autora su se bavili ispitivanjima količine glicerola u telu insekata i njegovom ulogom u zaštiti insekata od niskih temperatura i smrzavanja (Salt, 1957, 1959; Takehara i Asahina, 1960; Tanno, 1963; Sømme, 1964; Krunić i Salt, 1971). Utvrđeno je da je količina glicerola u nekih insekata u korelaciji sa stepenom njihove otpornosti na niske temperature i smrzavanje (Salt, 1969).

Samo mali broj insekatskih vrsta može da preživi smrzavanje dok svi ostali uginu ili trpe znatna oštećenja pri inokulativnom ili nukleativnom smrzavanju. Svi insekti koji su rasprostranjeni u hladnijim regionima, posebno oni za koje je smrzavanje letalno, moraju da bi prezimili, da poseduju neku vrstu adaptacije protiv niskih temperatura.

U ovom radu izložićemo značaj pothlađivanja, glicerola kao i nukleatora u rezistentnosti insekata na niske temperature i smrzavanje.

MATERIJAL I METODE

Temperature pothlađivanja (smrzavanja) insekata hlađenih pri stopi od 2—3°C/min. registrovane su sa aparatom za automatsko registrovanje temperatura.

REZULTATI I DISKUSIJA

Pothlađivanje. — Sposobnost insekata da se mogu pothlađivati je značajna adaptacija koja im omogućava da prežive nepovoljne niske temperature. Na tabeli 1 prikazane su tačke pothlađivanja razvojnih stupnjeva *Drosophila melanogaster*, *Anthophora parietina* i *Megachile rotundata*. Svi razvojni stupnjevi (i oni koji se hrane i oni koji se ne hrane) *D. melanogaster* poseduju izrazitu sposobnost pothlađivanja. Međutim, kod *A. parietina* i *M. rotundata* stupnjevi koji se hrane (larve i aktivni adulti) smrzavaju se na relativno visokim temperaturama, dok prepupe i pupe — stupnjevi koji se ne hrane (dijapauzirajući i prezimljujući stupnjevi) duboko se pothlađuju. Iz ovih rezultata bi se moglo zaključiti da kod *D. melanogaster* nije došlo do diferenciranja posebnog perzimljujućeg stupnja, možda i zbog toga što su svi njeni stupnjevi u poređenju sa mnogim drugim vrstama insekata veoma otporni na smrzavanje. Ako tome još dodamo da *D. melanogaster* živi na skrovitim i zaklonjenim mestima, onda se lako može objasniti njeno uspešno prezimljavanje u svim stupnjevima i činjenica da su sa prvim toplim danima veoma česte i brojne.

Međutim, *A. parietina* i *M. rotundata*, kao i mnoge druge vrste koje imaju dijapauzirajuće i prezimljujuće stupnjeve, poseduju izrazitu sposobnost pothlađivanja samo u tim stupnjevima.

Tab. 1. — Temperature smrzavanja* razvojnih stupnjeva *Drosophila melanogaster*, *Anthophora parietina* i *Megachile rotundata*.Freezing Temperatures of Different Stages of *Drosophila melanogaster*, *Anthophora parietina* and *Megachile rotundata*.

Stupanj Stage	<i>D. melanogaster</i>		<i>A. parietina</i>		<i>M. rotundata</i>	
	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{x} \pm Se$ (°C)	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{x} \pm Se$ (°C)	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{x} \pm Se$ (°C)
Jaje Egg	25	-28,0 ± 0,17	9	-26,0 ± 0,33	—	—
Larva I Larva I	30	-22,9 ± 0,16	12	- 7,0 ± 0,31	20	- 8,9 ± 0,17
Larva II Larva II	30	-16,0 ± 0,46	—	—	—	—
Prepupa Prepupa	—	—	20	-25,0 ± 0,73	21	-33,1 ± 0,53
Pupa Pupa	30	-20,5 ± 0,37	10	-23,6 ± 0,48	16	-19,1 ± 0,97
Adult Adult	35	-20,4 ± 0,27	24	- 6,2 ± 0,19	50	- 5,0 ± 1,10

* Temperatura smrzavanja je definisana kao temperatura pri kojoj u toku pothlađivanja konstatujemo temperaturni skok koji označava početak kristalizacije leda.

The freezing temperature is that temperature at which in supercooling a temperature jump occurs indicating the initiation of ice crystallization.

Pothlađivanje i temperature smrzavanja su karakteristične za insekatsku vrstu tj. za svaki njen razvojni stupanj i korišćenjem variacione statistike i dovoljnog broja primeraka u probi mogu korisno da služe i kao taksonomski karakteri.

Glicerol. — Brojni eksperimenti su pokazali da glicerol deluje kao zaštitna supstanca protiv štetnog ili letalnog dejstva niskih temperatura. Glicerol kod insekata deluje na dva načina: 1. sa većom koncentracijom glicerola povećava se mogućnost pothlađivanja i time jedinke izbegavaju smrzavanje, i 2. ukoliko se dogodi smrzavanje neke vrste koje poseduju velike količine glicerola mogu da prežive. Poznato je da su količine glicerola karakteristične za pojedine vrste insekata, kao i to da kod nekih vrsta kad se ujesen obrazuje kod dijapauzirajućih stupnjeva koncentracija glicerola se održava sve dok se dijapauza ne prekine (Sø m m e, 1964). Međutim, postoje i vrste (*M. rotundata* i *M. relativa* kod kojih koncentracija glicerola postepeno opada u toku dijapauze, ali se njihova rezistentnost na niske temperature značajnije menja samo kod *M. relativa* (Krunić i Salt, 1971).

Tab. 2. — Temperature smrzavanja razvojnih stupnjeva laboratoriskih linija *Drosophila melanogaster*.

Freezing Temperature of Different Developmental Stages of Laboratory Flies of *Drosophila melanogaster*.

Vrsta Species	Stupanj Stage	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{X} \pm Se$ (°C)
<i>D. melanogaster</i> Supstrat: kvasac Medium: yeast	Jaje Egg	60	-28,2 ± 0,26
	Larva I Larva I	27	-25,6 ± 0,09
	Larva II Larva II	60	-15,4 ± 0,56
	Pupa Pupa	60	-20,3 ± 0,22
	Adult Adult	93	-19,4 ± 0,53
	<i>D. melanogaster</i> Supstrat: kvasac kontaminiran sa nukleatorima* Medium: yeast contaminated by nucleators	Jaje Egg	33
Larva I Larva I		25	-23,2 ± 0,44
Larva II Larva II		42	-14,3 ± 0,29
Pupa Pupa		26	-20,4 ± 0,56
Adult Adult		33	-10,5 ± 0,35

* Kontaminacija je izvršena dodavanjem supstratu prašine u količini od 10% njegove ukupne težine. Prašina sadrži brojne nukleatore mineralnog i organskog porekla.

Contamination was accomplished by adding about 10% by weight of roadside dust. The dust contained numerous mineral and organic nucleators.

Merenjem temperatura smrzavanja pri maksimalnim i minimalnim količinama glicerola moglo bi se zaključiti da glicerol značajnije deluje na snižavanje temperatura smrzavanja samo ako je njegova koncentracija 5, 10 pa i više procenata od sveže težine tela, dok u koncentraciji do 5% uloga glicerola u pothlađivanju je neznatna.

Neke insekatske vrste bez glicerola mogu da prežive smrzavanje i njihovi krioprotektori su nepoznati. Međutim, neke insekatske vrste i sa velikim koncentracijama glicerola ne mogu da prežive smrzavanje. Veoma je verovatno da pored glicerola insekti poseduju i druge još nepoznate krioprotektivne supstance.

Tab. 3. — Temperature smrzavanja razvojnih stupnjeva koji se hrane (larve) i stupnjeva koji se ne hrane (prepupe) kod *Megachile rotundata* i *Anthophora parietina*

Freezing Temperatures of Feeding (Larval) and Non-feeding (Prepupal) Stages of *Megachile rotundata* and *Anthophora parietina*

Stupanj Stage	<i>M. rotundata</i>		<i>A. parietina</i>	
	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{X} \pm Se$ (°C)	Broj jedinki No of specimes	Temperature smrzavanja Freezing temperatures $\bar{X} \pm Se$ (°C)
Larva Larva	20	-8,9 ± 0,17	12	-7,0 ± 0,31
Prepupa Prepupa	21	-33,1 ± 0,53	20	-25,0 ± 0,73

Nukleatori. — Kao što je u uvodu napomenuto identitet nukleatora još uvek nije poznat. Međutim, njihova uloga u otpornosti insekata na niske temperature je eksperimentalno dokazana. Poznato je da se dodavanjem nukleatora nekim stupnjevima koji se hrane može veoma značajno uticati na njihove temperature smrzavanja. Na tabeli 2 vidi se da se adulti *D. melanogaster* hranjeni kvašćevim supstratom smrzavaju na oko -19°C, dok se adulti hranjeni na kvašćevom supstratu koji je kontaminiran nukleatorima smrzavaju na oko -10°C. Na tabeli 3 prikazane su razlike između tačaka smrzavanja larava (stupanj koji se hrani) i prepupa (stupanj koji se ne hrani) kod *M. rotundata* i *A. parietina*. Prilikom prelaska iz stupnja larve u stupanj prepupe kod ovih vrsta dolazi do pražnjenja creva. Ta adaptacija pražnjenja creva praćena je povećanjem otpornosti za oko 20°C posle čega dolazi do obrazovanja glicerola i daljeg snižavanja temperatura smrzavanja. Ovu pojavu velikog povećanja mogućnosti pothlađivanja koju donosi pražnjenje creva, moguće je objasniti samo odstranjivanjem nukleatora iz creva.

ZAKLJUČAK

Na osnovu iznetih rezultata moglo bi se zaključiti da je mogućnost pothlađivanja jedna od značajnih insekatskih adaptacija zahvaljujući kojoj oni izbegavaju štetno i letalno dejstvo smrzavanja. Prisustvo glicerola kao krioprotektivne supstance povećava sposobnost pothlađivanja. Nasuprot krioprotektivnim supstancama nukleatori (verovatno sitne čestice mineralnog i organskog porekla) smanjuju sposobnost pothlađivanja.

(Primljeno, 10. XII 1973)

LITERATURA

- Mason, B. J. (1956): The nucleation of supercooled water clouds. — *Sci. Prog.*, 44: 479—499.
- Kaku, S., Salt, R. W. (1968): Relation between freezing temperature and length of conifer needles. — *Can. J. Bot.*, 46: 1211—1213.
- Krunic, M. D. (1971): Influence of food on the cold-hardiness of *Megachile rotundata* (F.). — *Can. J. Zool.*, 49: 863—865.
- Krunic, M. D., Salt, R. W. (1971): Seasonal changes in glycerol content and supercooling points of *Megachile rotundata* (F.) and *M. relativa* Cress.—*Can. J. Zool.*, 49: 663—666.
- Polge, C., Smith, A., and A. S. Parkers (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. — *Nature* (London), 164: 666.
- Salt, R. W. (1953): The influence of food on cold-hardiness of insects. — *Can. Entomol.*, 85: 261—269.
- Salt, R. W. (1957): Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. — *Can. Entomol.*, 89: 491—494.
- Salt, R. W. (1959): Role of glycerol on cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan.). — *Can. J. Zool.*, 37: 59—69.
- Salt, R. W. (1968): Location and quantitative aspects of ice nucleators in insects. — *Can. J. Zool.*, 46: 329—333.
- Salt, R. W. (1969): The survival of insects at low temperatures. — *Symp. Soc. exp. Biol.*, 23: 331—350.
- Sømme, L. (1964): Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. — *Can. J. Zool.*, 42: 87—101.
- Takehara, I. and E. Asahina (1960): Frost-resistance and glycerol content in overwintering insects (in Japanese, English summary). — *Low Temp. Sci. B. Ser. Biol. Sci.*, 18: 57—65.
- Tanno, K. (1963): Frost-resistance in overwintering pupae of butterfly *Papilio xuthus* (in Japanese, English summary). — *Low Temp. Sci. Ser. B. Biol. Sci.*, 21: 41—53.
- Vali, G. (1968): Ice nucleation relevant to formation of hail. — McGill University Stormy Weather Group, *Sci. Rep. M. W.* — 58.

FREEZING TEMPERATURES OF SOME DEVELOPMENTAL STAGES OF DROSOPHILA MELANOGASTER (DIPTERA), ANTHOPHORA PARIETINA AND MEGACHILE ROTUNDATA (HYMENOPTERA)

M. D. KRUNIĆ and I. RADOVIĆ

Summary

Supercooling capacity is an important adaptation enabling certain insects to survive low temperatures. We have measured freezing temperatures of different developmental stages of *D. melanogaster*, *A. parietina* and *M. rotundata* (Table 1) and found that these temperatures are characteristic of the species and the stage. Therefore, with variational statistical analysis, freezing temperature could be used as a taxonomic character.

D. melanogaster does not have one particular diapausing or overwintering stage: all its developmental stages exhibit relatively high supercooling potential. *A. parietina* and *M. rotundata* on the other hand, do have diapausing stages, exhibiting a pronounced supercooling potential, which the active stages lack.

Glycerol is found in the bodies of insects. However, its role as a protective agent against freezing has been found to be significant if its level is relatively high, at least more than 5% of fresh body weight (Krunić and Salt, 1971).

The role of nucleators in insect cold-hardiness has recently been discussed (Salt, 1968; Kaku and Salt, 1968; Krunić, 1971). It has been experimentally shown that in an intact insect after certain time at a low temperature the first ice crystal forms in the gut, in the presence of nucleators. Introduction of nucleators (fine organic or mineral particles) with the food can greatly raise the freezing temperature (Table 2).

From Table 3 it may be seen that with their transformation from the larval into the prepupal stage *M. rotundata* and *A. parietina* become about 20°C more cold-hardy. This increase of cold-hardiness can only be explained by the fact that this transition also involves defecation, whereby a large number of nucleators are removed from the gut.