

Туйу ХАНСЕН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИЦЕРИНА И ГЛЮКОЗЫ В ДИАПАУЗИРУЮЩИХ КУКОЛКАХ КЛЕНОВОЙ СТРЕЛЬЧАТКИ

Переход от состояния активной жизнедеятельности к состоянию физиологического покоя достигается в основном изменением соотношения между двумя типами метаболизма. По мере торможения оксидиоза преобладающими в обмене веществ во время диапаузы становятся процессы гликолиза (Ушатинская, 1958, 1966; Тихонравова, 1974). В периоды, когда преобладают восстановительные процессы, наблюдаются значительное торможение интенсивности метаболизма и понижение чувствительности организма к воздействию неблагоприятных абиотических факторов, в частности холода. Это связано с включением специфических холодозащитных реакций, таких как увеличение количества глицерина и моносахаридов в тканях насекомых. Установлено, что отрицательные температуры среды играют значительную роль в накоплении глицерина (Dubach и др., 1959; Хансен, 1971, 1978). Насекомые, зимующие выше снегового покрова и подвергающиеся воздействию низких зимних температур, отличаются высоким содержанием глицерина. Для них характерны и более низкие точки переохлаждения во время зимовки (Хансен, 1980). Много неясного остается еще в регуляции метаболизма глицерина у диапаузирующих насекомых при разных температурах. Установлено, что у диапаузирующих насекомых глицерин накапливается как при отрицательных, так и при положительных (20—25° С) температурах (Chino, 1958; Asahina, 1966 и др.). Но имеются и данные, что в условиях 20° содержание глицерина у некоторых насекомых во время диапаузы не изменяется (Sømme, 1964, 1965) или даже уменьшается, как, например, у предкуколок *Monema flavescens* Walker, и опять повышается при создании для насекомых оптимальных для синтеза глицерина условий (Takehara, 1966). У некоторых насекомых во время зимовки отмечено очень высокое содержание сахаров: 10—15% по отношению к сырому весу (фруктоза составляла 4,5—7,7, глюкоза 3,0—4,8 и трегалоза 0,4%) (Таппо, 1964). Большое количество сахаров увеличивало и холодостойкость этих насекомых.

На основе современной концепции гормональной регуляции куколочной диапаузы считается, что она возникает при недостатке активационного гормона, вызывающем инактивацию проторакальных желез и прекращение выделения экдизона. При низких положительных температурах активность нейросекреторных клеток мозга восстанавливается — в этом и выражается сущность холодовой реактивации — и с наступлением благоприятных условий развитие насекомых продолжается. Имеются данные о том, что с помощью экдизона, ювенильного гормона или их аналогов (экдизоноидов и ювеноидов) можно ослабить или прервать куколочную диапаузу (Hsiao, Hsiao, 1969; Метспалу, 1980 и др.). Чтобы проследить за ходом формирования диапаузы или же реактивации, широко используется определение интенсивности газообмена. Но о реактивации можно судить и по изменению содержания

некоторых веществ, играющих важную роль во время зимовки насекомых. Поэтому целью настоящей работы было: определить сезонные изменения в содержании глицерина и глюкозы у куколок кленовой стрельчатки *Apatele aceris* L., выявить особенности влияния температуры среды во время диапаузы на метаболизм этих веществ, а также определить сезонные изменения холодостойкости куколок. Эти данные можно в дальнейшем использовать при изучении реактивирующего действия новых синтезированных ювенондов, способствуя, таким образом, разработке методов гормональной борьбы с вредными насекомыми.

Материал и методика

Кленовая стрельчатка *Apatele aceris* L. зимует в стадии куколки в состоянии глубокой диапаузы. Окукливание происходит в конце сентября или в первой половине октября в листьях, на поверхности почвы, а также в трещинах коры нижней части стволов деревьев. Таким образом, куколки обычно зимуют под снежным покровом, а в малоснежные зимы — над снежным покровом, т. е. находятся в условиях очень низких температур. Гусеницы кленовой стрельчатки для настоящего исследования были собраны в Тартуском районе с клена, конского каштана и дуба. Выращивали их в литровых стеклянных банках, в условиях, близких к природным. Куколки зимовали в природных условиях.

Хорошим показателем холодостойкости насекомых является точка переохлаждения, которую измеряли термоэлектрическим методом с помощью термопары медь-константан со скоростью охлаждения $0,5^{\circ}$ в минуту. Интенсивность дыхания измеряли прибором Варбурга (Коган, Щитов, 1967). Полиолы идентифицировали с помощью хроматографии на бумаге (Hansen, 1973), количественные анализы проводили методом Ренконена (Renkonen, 1962). Из полиолов в куколках обнаружен только глицерин. Идентификацию моносахаридов проводили также с помощью хроматографии на бумаге (Хансен, Вийк, 1981). Количественные анализы проводили с помощью антронового реактива (Хайс, Мацек, 1962). Содержание веществ выражено в миллиграммах на грамм сырого веса.

Результаты и их обсуждение

Сезонная динамика содержания глицерина и глюкозы и точки переохлаждения. Из рис. 1 видно, что накопление глицерина у куколок в природных условиях началось в середине октября, т. е. примерно через месяц после окукливания. Максимум был достигнут в первую половину декабря. Затем содержание глицерина начало постепенно падать и в мае достигло нуля. Концентрация глюкозы, наоборот, осенью в середине октября находилась на относительно высоком уровне, затем стала уменьшаться и, начиная с декабря, всю зиму находилась на низком уровне. Весной в апреле содержание глюкозы снова повышалось.

Точка переохлаждения куколок также изменялась посезонно, самой низкой была в декабре, во время максимальной концентрации глицерина (рис. 1). Диапаузирующие куколки содержали 6,9% глицерина и могли переохлаждаться до -32° . Способность к переохлаждению возрастала на 5,9% в осенне-зимний период. Повышение холодостойкости куколок кленовой стрельчатки в осенне-зимний период обусловлено накоплением в них глицерина. Глюкоза, вероятно, не участвует в холодозащитных реакциях этого вида. Уменьшение содержания глюкозы осенью в соответствии с увеличением содержания глицерина ука-

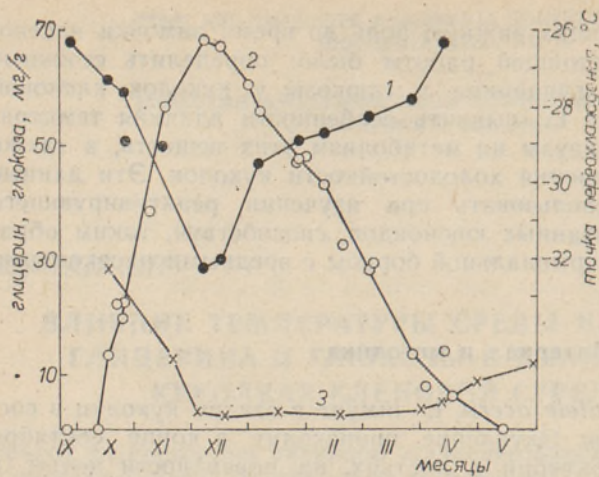


Рис. 1. Сезонные изменения точки переохлаждения (1), содержания глицерина (2) и глюкозы (3) у диапаузирующих куколок *Apatete aceris* L.

зывает на то, что, вернее всего, возможным источником глицерина являются углеводы. Уменьшение количества глицерина во второй половине зимовки не сопровождалось соответственным повышением содержания глюкозы. Низкое содержание глюкозы зимой характерно и для других насекомых (Mansingh, Smallman, 1972; Хансен и др., 1980). Установлено, что углеводы являются энергетическим субстратом для поддержания обмена веществ при отрицательных температурах.

Влияние температуры среды на содержание глицерина. Повышенное содержание глицерина в зимние месяцы у куколок кленовой стрелчатки указывает на то, что отрицательные температуры могут играть большую роль в регуляции метаболизма глицерина у этого вида. Из опытов выяснилось, что оптимальной температурой для накопления глицерина в октябре было -5° , а в январе -12° . В природных условиях содержание глицерина повышалось в среднем на $1,3 \text{ мг/г}$ в сутки, скорость понижения его во второй половине зимовки была гораздо ниже $-0,5 \text{ мг/г}$ в сутки. При перенесении куколок в комнатную температуру (20°) содержание глицерина у них уменьшалось в 4 раза быстрее, чем в природных условиях (начиная с декабря).

У насекомых, зимующих в состоянии неглубокого покоя (олигопауза, зимняя спячка), содержание глицерина быстро уменьшалось, когда их переносили в условия 20° , и снова повышалось под влиянием отрицательной температуры (Dubach и др., 1959; Хансен, 1971, 1976a). Они могли ресинтезировать глицерин в течение всего периода зимовки. Чтобы выяснить, имеется эта способность и у видов с глубокой диапаузой, поставили серию опытов. В разное время в течение зимовки куколки кленовой стрелчатки переносили из природных условий в условия 20° , а затем обратно в условия низких температур и соответственно определяли изменения содержания глицерина.

Как видно из табл. 1, у куколок кленовой стрелчатки, перенесенных в октябре в комнатную температуру (20°), содержание глицерина не понизилось, а даже немного повысилось. Уменьшение количества глицерина обнаруживалось у куколок, перенесенных в комнатную температуру примерно во время или после достижения максимальной концентрации глицерина. К этому времени завершалась и холодовая реактивация (восстанавливалась активность нейросекреторных клеток мозга), и при перенесении куколок в условия 20° они были способными развиваться. Интенсивность дыхания у куколок в природных условиях в конце января в среднем составляла $44,8 \text{ мм}^3 \text{O}_2/\text{г} \cdot \text{ч}$ ($34,0-65,0 \text{ мм}^3 \text{O}_2/\text{г} \cdot \text{ч}$), измеренная при 20° , а у нереактивированных особей —

Способность к ресинтезу глицерина у диапаузирующих куколок *Apatele aceris* L.

Температура содержания, °С	Число дней	Время определения	Глицерин, мг/г
Природные условия		16/X	13,6±0,0
20	31	16/XI	15,3±0,1
-5	33	19/XII	45,9±0,1
-12	43	29/XII	17,7±0,0
Природные условия		16/XI	56,8±0,1
20	29	15/XII	0,0±0,0
-5	38	22/I	65,9±0,0
Природные условия		6/XII	68,8±0,2
20	22	28/XII	54,2±0,0
-5	38	4/II	60,2±0,1
Природные условия		15/XII	67,2±0,2
20	26	10/I	13,5±0,4
20	33	17/I	0,0±0,0
-5	36	22/I	6,8±0,0
-12	36	22/II	14,5±0,0
Природные условия		26/I	47,6±0,1
20	9	4/II	20,0±0,1
20	14	9/II	5,2±0,0
20	25	20/II	1,3±0,0
20	30	25/II	0,0±0,0
-5	38	4/IV	0,6±0,0
Природные условия		3/III	28,2±0,0
20	17	20/III	0,0±0,0
-5	30	19/IV	2,0±0,0
Природные условия		26/III	13,5±0,0
20	6	1/IV	0,0±0,0
-5	27	28/IV	0,0±0,0
-5	33	4/V	0,0±0,0

36,8 мм³O₂/г·ч (26,4—43,0 мм³O₂/г·ч). Как видно из табл. 1, у диапаузирующих куколок кленовой стрельчатки, перенесенных в комнатную температуру в конце ноября—январе, глицерин исчезает полностью в течение одного месяца. Это наблюдалось также у диапаузирующих куколок стрельчатки пси *Apatele psi* L. (Хансен, 1978). Таким образом, понижение содержания глицерина при 20° у видов, зимующих в глубокой диапаузе, происходит гораздо медленнее, чем у видов с неглубоким типом покоя (Хансен, 1971). При понижении содержания глицерина у куколок кленовой стрельчатки отмечалось и уменьшение их холодостойкости. Например, при уменьшении содержания глицерина от 6,7 до 1,4% точка переохлаждения куколок повышалась от -32,0 до -26,7°.

Хорошей способностью к ресинтезу глицерина в условиях отрицательных температур куколки обладали только в первой половине зимовки, т. е. до достижения максимального содержания глицерина. К весне это свойство резко уменьшалось (табл. 1). Когда у куколок в природных условиях весь глицерин исчез, они оказались неспособными ресинтезировать его даже при оптимальной температуре. Весной, когда содержание глицерина у куколок в природных условиях находилось на низком уровне, при перенесении их в условия -5° содержание глицерина увеличивалось незначительно (табл. 2).

Из наших опытов следует, что уменьшение содержания глицерина у диапаузирующих насекомых наблюдается лишь после реактивации, а перед реактивацией в тканях насекомых существуют условия, способствующие увеличению содержания глицерина или сохранению его уровня независимо от температуры среды.

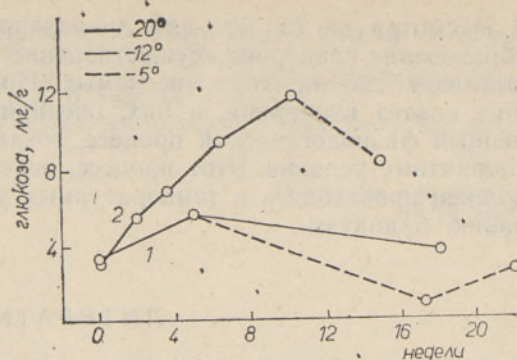
Изменение содержания глицерина в диапаузирующих куколках *Apatele aceris* L., находящихся в условиях 20 и -5°C

Температура содержания, $^{\circ}\text{C}$	Число дней	Время определения	Глицерин, мг/г
20		22/X	0,0 \pm 0,0
20		29/X	0,0 \pm 0,0
-5	33	1/XII	14,5 \pm 0,4
20		18/XI	0,0 \pm 0,0
20		29/XI	0,0 \pm 0,0
-5	32	31/XII	14,9 \pm 2,3
20		19/XII	0,0 \pm 0,0
-5	36	24/I	12,7 \pm 0,2
20		7/I	0,0 \pm 0,0
-5	86	2/IV	4,6 \pm 0,2
20		16/II	0,0 \pm 0,0
-5	28	16/III	0,0 \pm 0,0
Природные условия		21/IV	6,6 \pm 0,2
-5	49	9/VI	8,0 \pm 0,1
-5	71	10/VII	7,2 \pm 0,2
Природные условия		12/V	0,6 \pm 0,2
-5	59	10/VII	2,9 \pm 0,2

Глицерин образуется в насекомых во время диапаузы при преобладании процессов анаэробнозиса (Harvey, 1962). Однако и отрицательные температуры среды оказывают большое влияние на накопление его. Чтобы определить, какое количество глицерина в насекомых образуется без участия низких температур, следует в первую очередь избавиться от мешающего влияния акклимации. Для этого куколки кленовой стрелчатки содержались при комнатной температуре (20°) в чашках Петри, и в разные сроки у них определяли количество глицерина. Выяснилось, что в течение шести месяцев глицерин в куколках кленовой стрелчатки не образовывался (табл. 2). В это время не происходило и реактивации (бабочки не вылуплялись). Дыхание куколок находилось на низком уровне ($36,8 \text{ мм}^3 \text{O}_2/\text{г}\cdot\text{ч}$), что указывает на глубокую диапаузу. При перенесении куколок в условия -5° наблюдалось накопление глицерина. Чем ближе к весне, тем меньше глицерина в куколках образовывалось, а в марте его при -5° совсем не накапливалось (табл. 2). Холодостойкость у куколок в условиях 20° немного повышалась. Так, после окукливания средняя точка переохлаждения куколок равнялась $-26,5^{\circ}$, в течение зимы она колебалась от $-28,2$ до $-28,6^{\circ}$. Некоторое понижение точки переохлаждения после окукливания без влияния низких температур отмечено и у других видов (Хансен, 19766) и обусловлено физиологическими особенностями диапаузы.

В природных условиях образование глицерина в куколках кленовой стрелчатки наблюдалось лишь через месяц после окукливания, накопление глицерина через две недели или месяц после наступления диапаузы наблюдалось и у других видов (Takehara, 1966; Хансен, 1978). Известно, что у диапаузирующих предкуколок *Moneta flavescens* в условиях 20° глицерин не накапливается, а инъекция молочной кислоты вызывает образование глицерина и при комнатной температуре (Takehara, 1963). Это значит, что для синтеза глицерина в тканях насекомого должны быть благоприятные условия. Следовательно, хотя для

Рис. 2. Изменение содержания глюкозы у диапаузирующих куколок *Apatele aceris* L., находящихся при разных температурах. 1 — начало опыта 3 декабря, 2 — начало опыта 21 января.



диапаузирующих насекомых характерно образование глицерина, существование диапаузы само по себе еще не вызывает синтеза его. Прежде чем в насекомых начинается синтез глицерина, в них, наверное, должен происходить определенный физиологический процесс, создающий в тканях насекомого для синтеза глицерина благоприятные условия. Этот процесс зависит, вероятно, от температуры и должен происходить в температурных условиях, способствующих окончанию диапаузы.

Влияние температуры среды на содержание глюкозы. Опыты показали, что положительные температуры способствовали образованию глюкозы в куколках кленовой стрелчатки. Так, при перенесении куколки из природных условий в условия 20° содержание глюкозы возросло в них в течение 10 недель от 3,14 до 11,77 мг/г, а под влиянием температуры —5° уменьшалось (рис. 2). В начале декабря содержание глюкозы при 20° повышалось гораздо медленнее, чем в конце января. Уменьшение количества глюкозы происходило быстрее при температуре, оптимальной для синтеза глицерина. В куколках, содержащихся все время при комнатной температуре, количество глюкозы находилось на относительно высоком уровне — 19,3 мг/г, а после перенесения их в условия —12° в течение полутора месяца оно понизилось до 1,19 мг/г. Таким образом, при положительной температуре, тормозящей синтез глицерина, у куколок кленовой стрелчатки содержание глюкозы повышается и, наоборот, при отрицательной температуре среды, способствующей синтезу глицерина, количество глюкозы в куколках уменьшается. Это свидетельствует о том, что в куколках кленовой стрелчатки глицерин имеет углеводное происхождение.

На основе наших данных можно сделать следующие выводы.

1. Понижение точек переохлаждения у куколок кленовой стрелчатки в осенне-зимний период обусловлено накоплением в них глицерина. Глюкоза в холодозащитных реакциях этого вида не участвует.

2. Положительные температуры среды способствуют образованию глюкозы. При отрицательных температурах содержание глюкозы в диапаузирующих куколках кленовой стрелчатки уменьшается.

3. Влияние температуры среды на содержание глицерина в диапаузирующих куколках кленовой стрелчатки в течение зимовки имеет разный характер и сильно зависит от хода диапаузы и холодовой реактивации. Перед реактивацией в тканях диапаузирующих куколок существуют условия, способствующие или увеличению содержания глицерина, или сохранению его уровня независимо от температуры среды. Уменьшение содержания глицерина в диапаузирующих куколках наблюдается лишь после реактивации. Способность к ресинтезу глицерина при отрицательных температурах к весне резко уменьшается.

4. Несмотря на то, что для диапаузирующих насекомых характерно образование глицерина, существование диапаузы само по себе еще не вызывает синтеза его в насекомых. Прежде чем в насекомых начинается синтез глицерина, в них, очевидно, должен происходить определенный физиологический процесс, создающий в тканях для этого благоприятные условия. Этот процесс, вероятно, зависит от температуры и должен происходить в температурных условиях, способствующих окончанию диапаузы.

ЛИТЕРАТУРА

- Коган А. Б., Щитов С. И. Техника физиологического эксперимента. М., 1967, 600—607.
- Метспалу Л. Прекращение куколочной диапаузы у капустной белянки воздействием ювеноида. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1980, 29, 306—312.
- Тихонравова Н. М. Соотношение и смена аэробноза и анаэробноза в онтогенезе колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и капустной белянки (*Pieris brassicae* L.). — В кн.: Вопросы экологии и физиологии беспозвоночных. М., 1974, 45—81.
- Ушатинская Р. С. Некоторые физиологические и биохимические особенности диапаузы колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). — В кн.: Колорадский жук и меры борьбы с ним. М., 1958, 2, 150—185.
- Ушатинская Р. С. Влияние экологических условий зимовки на тканевый метаболизм колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). — В кн.: Экология и физиология диапаузы колорадского жука. М., 1966, 69—98.
- Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
- Хансен Т. Исследование содержания многоатомных спиртов в зимующих стадиях насекомых в связи с их холодостойкостью. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей (мат. симпозиума). 1971, 137—142.
- Хансен Т. Холодостойкость кородея *Polygraphus polygraphus* L. — Тез. докладов научн.-практ. конф. «Пути внедрения прогрессивных методов защиты растений в сельскохозяйственное производство» 28—30 июня 1976 г. Вредители сельскохозяйственных культур и леса. Рига, 1976а, 129—131.
- Хансен Т. О сезонных изменениях способности к переохлаждению у диапаузирующих куколок горчаковой совки (*Mamestra persicariae* L.). — Изв. АН ЭССР. Биол., 1976б, 25, 20—24.
- Хансен Т. О сезонных изменениях в содержании глицерина у куколок *Apatele psi* L. двух разных популяций. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1978, 27, 301—305.
- Хансен Т. Содержание глицерина и холодостойчивость у холодостойких насекомых. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1980, 29, 25—31.
- Хансен Т., Вийк М. Биохимические изменения у северного лесного муравья во время зимовки. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1981, 30, 100—104.
- Хансен Т., Вийк М., Луйк А. Биохимические изменения и холодостойкость у зимующих жуков кородея-типографа *Ips typographus* L. (*Coleoptera, Ipsidae*). — Энтомол. обзор., 1980, 2, 249—253.
- Asahina, E. Freezing and frost resistance in insects. — In: Cryobiology, 1966, 451—486.
- Chino, H. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol during diapause. — J. Insect Physiol., 1958, 2, 1—12.
- Dubach, P., Pratt, D., Smith, F., Stewart, C. M. Possible role of glycerol in the winter-hardiness of insects. — Nature, 1959, 184, 288—289.
- Hansen, T. Variations in glycerol content in relation to cold-hardiness in the larvae of *Petrova resinella* L. (*Lepidoptera, Tortricidae*). — ENSV TA Toim. Biol., 1973, 22, 105—112.
- Harvey, W. R. Metabolic aspects of insect diapause. — Ann. Rev. Entomol., 1962, 7, 57—80.
- Hsiao, C., Hsiao, T. H. Insect hormones: their effects on diapause and development of Hymenoptera. — Life Sci., 1969, 8, 767—774.
- Mansingh, A., Smallman, B. N. Variation in polyhydric alcohol in relation to diapause and cold-hardiness in the larvae of *Isia isabella*. — J. Insect Physiol., 1972, 18, 1565—1571.
- Renkonen, O. Determination of glycerol in phosphatides. — Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 367—369.
- Sømme, L. Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. — Canad. J. Zool., 1964, 42, 87—101.
- Sømme, L. Further observations on glycerol and cold-hardiness in insects. — Canad. J. Zool., 1965, 43, 765—770.

- Takehara, I. Glycerol in a slug caterpillar. II. Effect of some reagents on glycerol formation. — *Low Temp. Sci. Ser. B*, 1963, 21, 55—60.
- Takehara, I. Natural occurrence of glycerol in the slug caterpillar, *Monema flavescens*. — *Contr. Inst. Low Temp. Sci. Ser. B*, 1966, 14, 1—34.
- Tanno, K. High sugar levels in the solitary bee *Ceratina*. — *Low Temp. Sci. Ser. B*, 1964, 22, 51—57.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/IX 1981

Tiiu HANSEN

TEMPERATUURI MÖJUST VAHTRA-NOOLÖOLASE DIAPAUSIS NUKKUDE GLÜTSEROOLI- JA GLÜKOOSISISALDUSELE

Artiklis on käsitletud sesoonseid muutusi vahtra-noolöölase *Apatele aceris* L. diapausis nukkude glütserooli- ja glükoosisisalduses ning allajahtumisvõimes. Nukkude külmakindluse suuremine sügis-talvisel perioodil on tingitud glütserooli kogunemisest neisse. Glükoos selle liigi külmakaitse reaktsioonides ilmselt ei osale. Positiivsed temperatuurid soodustavad glükoosi teket, negatiivsetel nukkude glükoosisisaldus väheneb.

Uuriti ka glütserooli resünteesi kogu talvitusperioodi vältel. Oktoobris väljast toasooja toodud nukkudel glütserooli hulk ei vähenenud, kuid alates novembri lõpust kadus see ühe kuu jooksul (väljas talvituvatel nukkudel lähenes samal ajal talvine maksimum). Tegu oli pöörduva muutusega, s. t. kui nukud viidi tagasi miinustemperatuuri, taastus glütserooli süntees. Pärast reaktivatsiooni vähenes glütserooli resünteesi võime nukkudel tunduvalt. Alates aprillist oli glütserooli kadumine pöördumatu.

Katsetest selgus, et kuigi glütserooli teke on diapauseeruvatele putukatele iseloomulik, ei ole diapaus selle ainus põhjus, vaid glütserooli sünteesile peab eelnema selleks soodsaid tingimusi loov füsioloogiline protsess, mis tõenäoliselt kulgeb diapausi lõppemist soodustavates temperatuuritingimustes.

Tiiu HANSEN

EFFECT OF ENVIRONMENTAL TEMPERATURE ON GLYCEROL AND GLUCOSE CONTENT IN *APATELE ACERIS* L. DIAPAUSING PUPAE

Seasonal changes in glycerol and glucose contents and supercooling points in the hibernating pupae of *A. aceris* are investigated (Fig. 1). Increase in cold-hardiness in the autumn/winter period is due to the accumulation of glycerol in the pupae; glucose evidently does not take any part in the cold-protection reactions in this species. The effect of environmental temperature on glycerol and glucose contents in the diapausing pupae has been studied. At room temperature (20°C) an increase in the glucose content was observed, but in low temperature conditions it decreased (Fig. 2).

Table 1 shows the changes of the glycerol content in the pupae which were first kept in outdoor conditions, then transferred to 20° and finally again to low temperature of -5 and -12°. In October, at 20° the glycerol content in the pupae did not decrease; instead, a slight increase was observed. From the end of November, when the glycerol content had reached the highest level, at 20° glycerol disappeared within a month. That loss was reversible. That is, the returning of the specimens to low temperatures resulted in a re-synthesis of glycerol. After the cold reactivation the capacity for glycerol formation sharply decreased. Beginning with April, the disappearance of glycerol proved to be irreversible, even at the optimum temperature for glycerol accumulation.

There was no accumulation of glycerol within six months in the diapausing pupae kept at a constant temperature of 20° (Table 2), at which temperature the insects were unable to develop further to imagos. The accumulation of glycerol occurred in the pupae kept outdoors not until a month had passed after pupation. It is supposed that though the diapausing insects are characterized by an accumulation of glycerol, the existence of the diapause alone is not sufficient for glycerol synthesis. Before an accumulation of glycerol can occur in the diapausing insects, a certain physiological process must take place, creating appropriate conditions for it in insect tissues. Probably it is a process depending on temperature, and it must take place under temperature conditions favouring the termination of the diapause.