Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 48, No 1, Spring & Summer 2017 (139-150)
DOI: 10.22059/ijpps.2017.204400.1006705

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۶ (ص ۱۵۰-۱۳۹)

ترکیب‌های محافظ سرما در شفیره‌های آزمایشگاهی و زمستان‌گذران سفیدهٔ بزرگ کلم *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae)

مریم عطاپور*
استادیار عضو هیئت علمی پژوهشکدهٔ کشاورزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، گروه تولیدات گیاهی، آزمایشگاه حشره‌شناسی کاربردی، تهران، ایران، صندوق‌پستی ۱۱۱-۳۳۵۳۵
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳)

چکیده

سفیدهٔ بزرگ کلم (.*Pieris brassicae* (L، از آفات مهم گیاهان خانوادهٔ چلیپاسانان بوده که به‌صورت شفیره روی گیاهان مختلف یا دیگر پناهگاه‌ها، زمستان را پشت سر می‌گذارد. در زمینهٔ تغییرپذیری فیزیولوژیکی این آفت در طول زمستان که آن را در برابر دماهای پایین متحمل می‌سازد اطلاعات کمی در دست است. لذا در این بررسی، ترکیب‌های محافظ سرما در حشرات گردآوری‌شده در ماه‌های پاییز و زمستان و همچنین شفیره‌های آزمایشگاهی که به مدت یک هفته در دماهای ۲۷، ۱۵، ۱۰، ۷ و ٤ درجهٔ سلسیوس تیمار شده بودند با کمک LC/MS شناسایی و روند تغییرپذیری آن‌ها با کمک HPLC بررسی شد. همچنین تغییر گلیکوژن به‌عنوان مهم‌ترین منبع ترکیب‌های محافظ سرما بررسی شد. چهار ترکیب ترهالوز، سوربیتول، گلوکز و اینوزیتول شناسایی شدند که در میان آن‌ها ترهالوز و پس از آن سوربیتول بیشترین افزایش را در ماه‌های زمستان نشان دادند و به موازات این تغییرپذیری‌ها کاهش معنی‌داری در میزان گلیکوژن مشاهده شد. همچنین دو ترکیب ترهالوز و سوربیتول در شفیره‌های آزمایشگاهی تیمارشده در دمای ۷ و ٤ درجهٔ سلسیوس به طرز معنی‌داری افزایش یافتند. به‌این‌ترتیب به نظر می‌رسد افزایش ترهالوز و سوربیتول به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب محافظ سرما نقش به سزایی را در تحمل دماهای پایین زمستان در این حشره ایفا کند و دماهای زیر ۱۰ درجهٔ سلسیوس سبب القای این ترکیب‌ها در این شفیره‌ها شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیب‌های محافظ سرما، ترهالوز، سفیدهٔ بزرگ کلم، سوربیتول، گلیکوژن.

Cryoprotectants in lab-reared and overwintering pupae of large cabbage white, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae)

Maryam Atapour*
Assistant Professor. Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). P.O. Box: 33535111, Tehran, Iran
(Received: Apr. 12, 2016 - Accepted: Feb. 11, 2017)

ABSTRACT

The large cabbage white, *Pieris brassicae* (L.), is a pest of Brassicaceae family which overwinters as a pupa on different host plants or other shelters. Little information is available on the physiological changes during overwintering of this pest and its cold tolerance. In the current study, the cryoprotectants were identified by LC/MS and their changes were examined by HPLC in specimens collected during the months of autumn and winter, as well as lab-reared pupae which treated one week at 27, 15, 10, 7, and 4 °C. The changes of glycogen content were investigated as the main source of cryoprotectants. Four compounds of trehalose, sorbitol, glucose, and inositol were identified and trehalose and sorbitol showed the highest increase in the winter months and these changes were accompanied by a significant decrease in the glycogen content. In lab-reared pupae treated in 7 and 4 °C, trehalose and sorbitol significantly increased. Therefore, it seems that trehalose and sorbitol, as the most important cryoprotectants, play a significant role in tolerating of low temperatures of winter and tolerating temperatures below 10 °C can induce the production of such compounds in this species.

Keywords: Cryoprotectants, glycogen, large cabbage white, trehalose, sorbitol.

* Corresponding author E-mail: atapour@irost.org

مقدمه

اهمیت ترکیب‌های محافظ سرما در بقای حشرات زمستان گذران پس از انتشار مقاله Chino (1957) در Nature مبنی برافزایش تدریجی سوربیتول و گلیسرول در تخم‌های دیاپوزی کرم ابریشم، مورد توجه قرار گرفت (Salt, 1961). این ترکیب‌ها میزان تحمل به سرما و یخزدگی را افزایش می‌دهند و بنابراین یاخته را از انواع آسیب‌های ناشی از سرما و نیز یخزدگی محافظت می‌کنند. واژهٔ "cryoprotectants" هنگامی‌که استفاده می‌شود بیشتر به گلیسرول و دیگر الکل‌های پلی‌هیدریک یا همان پلی‌ال‌ها (مانند سوربیتول، مانیتول، ریبیتول، اریتریتول، تریتول، اتیلن گلیکول و غیره) و قندهایی مانند ترهالوز یا گلوکز اشاره دارد بااین‌حال برخی ترکیب‌های دیگر با وزن‌های مولکولی پایین، مانند اسیدهای آمینه به‌ویژه پرولین و آلانین نیز می‌توانند در این دسته قرار گیرند (Storey & Storey, 1991).

ترکیب‌های کربوهیدراتی محافظ سرما به‌طور عمده از ذخایر گلیکوژن موجود در اجسام چربی[1] که در طول تابستان اندوخته می‌شوند مشتق می‌شوند (Worland *et al.*, 1998; 2006) و مسیرهای زیست‌ساخت (بیوسنتز) آن‌ها توسط Storey & Storey (1991) مرور شده است. تغییرپذیری آنزیم‌هایی که در فرایند سوخت‌وساز قندها و پلی‌ال‌ها دخیل هستند همچنین می‌توانند تحت تأثیر هورمون‌هایی قرار گیرند که در فرایند دیاپوز و یا تغییر رشدی حشره دخیل هستند و ساخت آن‌ها با فرارسیدن زمستان تحت تأثیر محرک‌های نوری و یا دمایی تحریک می‌شود (Lee, 2010).

سفیدهٔ بزرگ کلم، *Pieris brassicae* (L.)، از آفات مهم گیاهان خانوادهٔ چلیپاسانان است که با افزایش سطح زیر کشت گیاهان دانه روغنی مانند کلزا به‌ویژه در سال‌های اخیر بر اهمیت آن افزوده شده است. این آفت ۲-۴ نسل در سال داشته و زمستان‌گذرانی آن به‌صورت شفیره روی گیاهان میزبان یا پناهگاه مناسب است. این حشره در بیشتر نواحی ایران به‌ویژه در استان‌های گیلان و مازندران و به‌ویژه در شهرهای بابل، قائم‌شهر، رامسر و تنکابن از مهم‌ترین آفات سبزی و صیفی به شمار می‌رود و در همه‌جا قابل مشاهده است (Khanjani, 2006). روبه‌رو شدن لاروهای سنین آخر (سن چهارم و پنجم) با روزهای کوتاه سبب القا دیاپوز در شفیره‌های زمستان گذران می‌شود (Danilevskii, 1965; Pullin & Bale, 1989b).

در بررسی‌های گذشته روی تغییرپذیری ترکیب‌های محافظ سرما در این حشره، دو ترکیب به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب محافظ سرما گزارش شده است. در برخی بررسی‌ها مانند Moreau *et al.* (1981) "ترهالوز" به‌عنوان ترکیبی که بیشترین تغییر را در رویارویی با سرما از خود نشان می‌دهد معرفی‌شده است و روی این تغییرپذیری‌ها در هنگام دیاپوز و رشد طبیعی حشره بررسی شده است. در برخی بررسی‌های دیگر مانند Pullin & Bale (1989b) "سوربیتول" به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب شناسایی‌شده و تأثیر عامل‌های مختلف روی تغییر آن بررسی شده است. در این بررسی، تغییر ترکیب‌های سرما در شفیره‌های زمستان‌گذران گردآوری‌شده از شمال ایران و همچنین شفیره‌هایی که در آزمایشگاه پرورش و در دماهای مختلف تیمار شده بودند، بررسی شد. همچنین تغییر غلظت گلیکوژن و چربی کل به‌عنوان مهم‌ترین ذخایر انرژی در ماه‌های سرد سال نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گردآوری حشرات

شفیره‌های سفیدهٔ بزرگ کلم در ماه‌های آبان ۱۳۹۰ تا فروردین ۱۳۹۱ به‌طور ماهانه (بین دوازدهم تا پانزدهم هر ماه) از کشتزارهای کلزای اطراف گرگان گردآوری شدند و برای جلوگیری از وارد آمدن تکانهٔ (شوک) دمایی، درون ظرف پلاستیکی دوجداره با حجم ۱/۵ لیتر گذاشته و بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل شدند. این شفیره‌های زمستان گذران بیشتر روی تنهٔ درختان یا گیاهان و بناهای اطراف به‌صورت عمودی و با کمک یک کمربند ابریشمی بسیار نازک خود را مستقر

1. Fat bodies

ساخته بودند. پس از آن شفیره‌ها با ترازویی با دقت ۰/۰۰۱ گرم (A&D, Japan) توزین شده و در فریزر ۸۰- درجهٔ سلسیوس تا انجام آزمایش‌ها نگه‌داشته شدند. در هر ماه به‌طور میانگین سی نمونه گردآوری شد که برای آزمایش‌های مختلف به‌طور تصادفی استفاده شدند.

پرورش حشرات و تیمارهای دمایی شفیره‌ها

به‌منظور پرورش سفیدهٔ بزرگ کلم در آزمایشگاه، از قفسه‌های توری با ابعاد ۱/۵×۱×۱/۲ متر (ارتفاع×عرض×طول) استفاده شد. درون هر قفس پنج گلدان کلم و بیست شفیره قرار داده شد. پس از ظهور حشرات کامل محلول آب عسل ۱۰درصد به‌منظور تغذیهٔ آن‌ها درون قفس گذاشته شد. پس از تخم‌ریزی حشرات کامل، لاروها از برگ‌های کلم تغذیه کرده و در نتیجه در فاصله‌های زمانی لازم، گلدان‌های جدید جایگزین می‌شدند. قفس‌ها و گلدان‌ها در اتاق رشد و در شرایط ۲±۲۷ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. شفیره‌های نسل دوم که در این شرایط پرورش‌یافته بودند برای تیمارهای دمایی استفاده شدند. این شفیره‌ها پس از ۲۴ ساعت از زمان ظهور شفیره، برای مدت یک هفته در دمای ۲۷، ۱۵، ۱۰، ۷ و ۴ درجهٔ سلسیوس درون اتاقک رشد (انکوباتور) قرار داده شدند (۶ شفیره در هر دما) و آنگاه همانند مرحلهٔ پیش در فریزر ۸۰- درجهٔ سلسیوس تا انجام آزمایش‌ها نگه‌داشته شدند. سرعت کاهش دما از دمای آزمایشگاه تا دمای مورد نظر ۱ °C/min بود.

شناسایی و اندازه‌گیری قندها و پلی‌ال‌ها

برای استخراج و اندازه‌گیری میزان قندهای الکلی موجود در بدن حشرات کامل، روش به روز و بهینه‌شدهٔ Pulin & Bale (1989a) استفاده شد. هر نمونه متشکل از یک شفیره در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد درون هاون‌چینی همگن شده و به درون کرایوتیوب‌های سترون‌شده ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند، سپس نمونه‌ها برای مدت پانزده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. قسمت رویی نمونه از رسوب جدا و برای شناسایی قندهای الکلی، درون کرایوتیوب‌های سترون‌شده ریخته شد. از رسوب باقی‌مانده برای اندازه‌گیری گلیکوژن استفاده شد. سپس کرایوتیوب‌ها در آون تحت خلأ (Memert, model VO400, Germany) در دمای ۳۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا حلال آن تبخیر شود. پس از تبخیر کامل حلال ۲۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به رسوب باقی‌مانده اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. پیش از تزریق نمونه به دستگاه، نمونه‌ها با صافی سر سرنگی سلولز استات با روزنه‌های ۰/۴۵ میکرومتر (Sartorius, France)، صاف شد.

قندهای الکلی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Waters, Milford, MA, USA) و مجهز به ستون ویژهٔ تجزیهٔ کربوهیدرات‌ها (Ca 59305-U, 300 by 7.8 mm, Supelco-Sigma Aldrich)، جداسازی شدند. فاز متحرک از آب HPLC تشکیل شده بود، سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست (Refractive Index Detector) بود. جداسازی قندها در دمای ۸۰ درجهٔ سلسیوس برای ستون و آشکارساز انجام شد. فاز متحرک به‌وسیلهٔ گاز هلیوم گاززدایی شد. پس از انجام تنظیمات دستگاه و پایدار شدن آن، نمونهٔ قندی تهیه‌شده از کل بدن حشرات کامل به حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق و کروماتوگرام آن ثبت شد.

برای اندازه‌گیری یا تجزیهٔ کمی قندهای الکلی جداسازی‌شده، از روش رسم منحنی استاندارد استفاده شد. برای این منظور استانداردهای مختلف شامل ترهالوز، گلوکز، اینوزیتول و سوربیتول (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر (حل‌شده در آب با خلوص HPLC) تهیه و به دستگاه تزریق شد آنگاه منحنی استاندارد (سطح زیر پیک در برابر غلظت) برای هر ترکیب در نرم‌افزار Excel رسم شد. با توجه به زمان بازداری، نوع قند موجود در نمونه و با توجه به سطح زیر پیک و منحنی درجه‌بندی، غلظت جزء مورد نظر در نمونه اندازه‌گیری شد.

برای اطمینان خاطر از شناسایی قندها پلی‌ال‌ها و زمان‌های بازداری آن‌ها از LC/MS استفاده شد. به این منظور ستون مخصوص جداسازی کربوهیدرات‌ها با شرایط کروماتوگرافیکی یادشده در پیش به آشکارسازی که جداسازی آن بر پایهٔ جرم یونی بود (Ion trap mass spectrometer instrument, equipped with an ESI ion source, Thermo Finnigan, USA) در حالت positive-ion متصل شد و mass spectrum استاندارد و نمونه‌ها در حالت full-scan به دست آمد و با هم مقایسه شد.

اندازه‌گیری گلیکوژن

از مواد ته‌نشین‌شدهٔ به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ در اندازه‌گیری قندها، برای اندازه‌گیری گلیکوژن استفاده شد. استخراج گلیکوژن بنا بر روش Hansen *et al.* (1951) با تغییرپذیری جزئی صورت گرفت. پس از آبشویی نمونه‌ها یک‌بار با اتانول ۷۰ درصد و یک‌بار با آب دو بار تقطیر، به هر نمونه ۱ میلی‌لیتر محلول پتاس(KOH) ۳۰درصد اضافه شد و پس از مخلوط کردن به مدت سی دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. پس از یکنواخت شدن محلول و ۲۴ ساعت نگه‌داری در یخچال، محلول رویی از رسوب جدا و در ریز لوله (میکروتیوب)های سترون‌شده ریخته شد. سپس ۰/۸ میلی‌لیتر محلول رسوب‌گذاری (دو قسمت NaCl ۲ درصد و ۷ قسمت اتانول ۹۵ درصد) برای رسوب گلیکوژن به محلول اضافه شد و نمونه‌ها به یخچال منتقل شدند و پس از گذشت سه ساعت ریزلوله‌ها از یخچال خارج و محلول رویی دور ریخته شد. پس از آب شویی نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر به هرکدام از نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر واکنشگر الکلی و۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و میزان گلیکوژن موجود در نمونه‌ها با دستگاه طیف‌سنج نوری (JENWAY UV-Vis model Genova 2129) در طول‌موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آنگاه با استفاده از منحنی استاندارد میزان گلیکوژن موجود در نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم در ۱ گرم وزن تر حشره (mg/g f.w.) تعیین شد. بدین ترتیب که مقادیر مختلفی از گلیکوژن (۰/۲۵ تا ۲ میلی‌گرم) در ۵ میلی‌لیتر واکنشگر الکلی و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل و میزان جذب آن‌ها در دستگاه خوانده شد و بر پایهٔ آن منحنی استاندارد ترسیم و غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه‌گیری چربی کل

برای استخراج چربی کل از روش Folch (Folch *et al.*, 1957) با کمی تغییر استفاده شد. به این منظور پس از همگن کردن هر شفیره، آن را به لولهٔ آزمایش ۵cc منتقل کرده، ۱cc متانول خالص و سپس ۲cc کلرفرم به آن اضافه شد و خوب هم زده شد. آنگاه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و محلول رویی درون لولهٔ آزمایش‌هایی با وزن مشخص منتقل شدند. در مرحلهٔ بعدی ۰/۷۵cc محلول کلرید پتاسیم ۰/۸۸ درصد به نمونه‌ها اضافه شد و بی‌درنگ دو لایه تشکیل شد. لایهٔ رویی که شامل آب و متانول بود دور ریخته شد و به لایهٔ پایینی که حاوی چربی و کلرفرم بود ۰/۵ cc محلول آب دو بار تقطیر و متانول (به نسبت مساوی) اضافه شد و دوباره دو لایه شکل گرفت که لایهٔ رویی دور ریخته و لایهٔ زیرین درون آون تحت خلأ قرار داده شد تا حلال‌های آن تبخیر شود. پس از تبخیر کامل حلال، لوله‌های آزمایش دوباره توزین شدند و اختلاف وزن آن‌ها که در حقیقت ناشی از وزن چربی کل موجود در نمونه بود اندازه‌گیری شد.

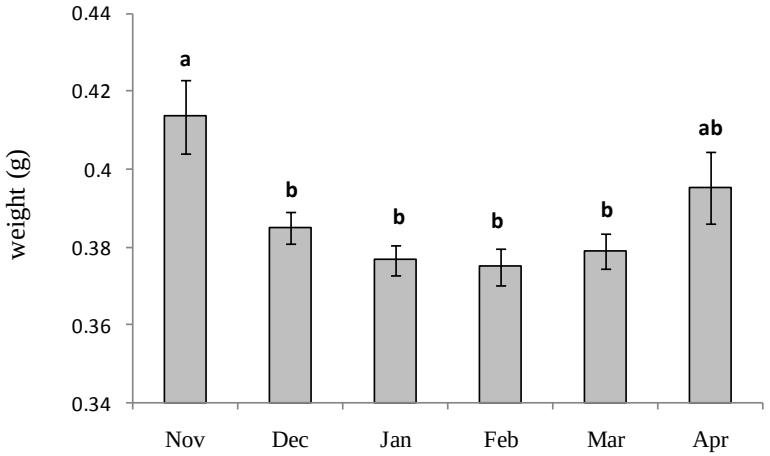
تجزیهٔ آماری

اطلاعات به‌دست‌آمده به‌صورت خطای معیار± میانگین (Mean ± Standard Error) گزارش شدند. تجزیهٔ داده‌ها با روش تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسهٔ میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (18.0) انجام شد. به‌منظور بررسی روابط همبستگی بین دو متغیر از آزمونPearson correlation استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی وزن شفیره‌های گردآوری‌شده نشان داد که به‌طور معنی‌داری ($F_{5,157} = 5.388$; $P<0.001$) در آذرماه این رقم کاهش داشته به‌طوری‌که از ۰/۰۰۹± ۴۱۳/۵۶

میلی‌گرم در آبان به ۳۸۵/۱۳±۰/۰۰۴ میلی‌گرم در آذر کاهش یافت و پس از آن تا حدودی ثابت ماند و تنها افزایش ناچیزی در فروردین از خود نشان داد، البته معنی‌دار نبود (شکل۱).



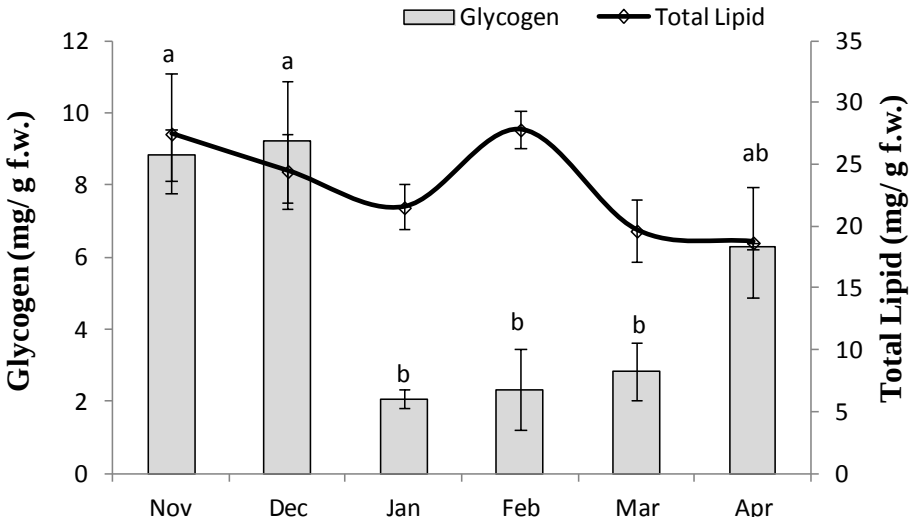
شکل ۱. تغییرات در وزن شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم جمع‌آوری‌شده از آبان ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲.
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.
Figure 1. Changes in weight of overwintwring pupae of large cabbage white collected in Nov 2012 to April 2013. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

غلظت گلیکوژن نیز در ماه‌های مختلف با تغییر چشمگیر و معنی‌داری همراه بود ($F_{5,12}$=12.2; P< 0.001) به‌طوری‌که در دو ماه اول نمونه‌برداری حدود ۹ mg/g f.w. اندازه‌گیری شد اما این میزان در سه ماه زمستان به حدود ۲ میلی‌گرم کاهش یافت و دوباره در فروردین سال بعد با کمی افزایش به حدود ۶ میلی‌گرم افزایش یافت (شکل ۲). از سویی تغییر چربی کل در طول ماه‌های مختلف معنی‌دار نبود هرچند که به‌طورکلی از آبان (۴/۸ ± ۲۷/۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر) تا فروردین (۴/۵ ± ۱۸/۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر حشره) روند کاهشی از خود نشان داد (شکل ۲). بررسی‌ها نشان داده‌اند که منبع اصلی ترکیب‌های محافظ سرما در طول ماه‌های سرد گلیکوژن است (Worland *et al*., 2006). مسیر بیوشیمیایی این فرایند با فعال شدن آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز در یک سامانهٔ هورمونی که در دمای ۵+ تا ۵- درجهٔ سلسیوس راه‌اندازی می‌شود، آغاز می‌شود (Storey & Storey, 1981; Pfister & Storey, 2002). این ترکیب‌ها و گلیکوژن همچنین می‌توانند در نتیجهٔ تغییر دمایی به یکدیگر تبدیل شوند (Storey & Storey, 1986). تنظیم این ترکیب و تبادل‌ها در ارتباط با دو آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز کیناز (GPK) و پروتئین فسفوتاز ۱ (PP1) که خود تحت کنترل آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز بوده، است (Hayakawa, 1985). کاهش چشمگیر گلیکوژن در زمان کاهش دما و افزایش ترکیب‌های محافظ سرما در حشرات پرشماری مانند شفیره‌های *Hyphantria cunea* (Drury) (Li *et al*., 2001)، *Mamestra brassicae* L. (Ding *et al*., 2003)، لاروهای *Enosima leucotaeniella* (Ragonot) (Goto *et al*., 1998) و یا لاروهای زمستان‌گذران ساقه‌خوار برنج (Atapour & Moharamipour, 2011) گزارش شده است.

با توجه به کاهش معنی‌دار گلیکوژن در این بررسی، به نظر می‌رسد این ترکیب در شفیره‌های زمستان گذران سفیدهٔ کلم نقش مهمی در تولید ترکیب‌های محافظ سرما داشته باشد. هرچند که تغییر چربی کل نیز در طی این ماه‌ها روند کاهشی داشت و لذا برای اظهارنظر قطعی در مورد منشأ افزایش ترکیب‌های محافظ سرما در ماه‌های مختلف، بررسی‌های تکمیلی آنزیمی ضروری به نظر می‌رسد.

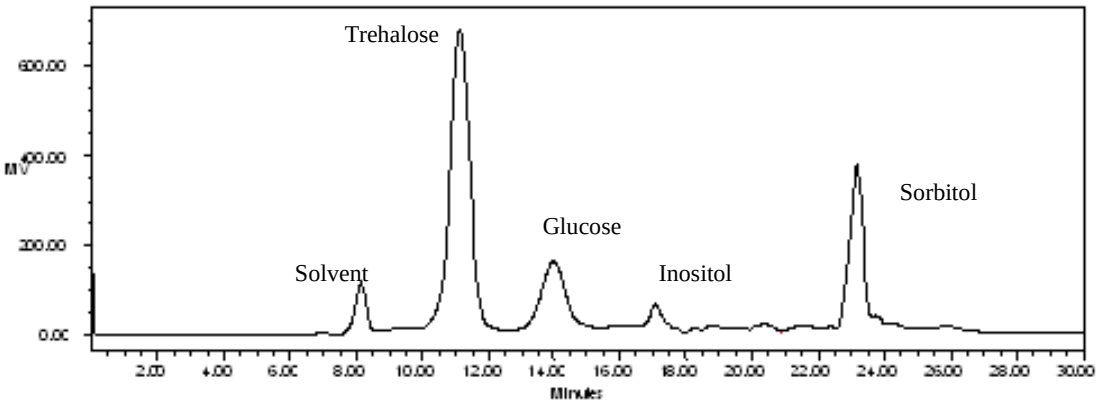
دو قند ترهالوز و گلوکز و دو قند الکلی (پلی‌ال) سوربیتول و اینوزیتول در شفیره‌های زمستان گذران سفیدهٔ کلم شناسایی شدند (شکل ۳) که بیشترین

افزایش در ماه‌های سرد متعلق به ترهالوز و سپس سوربیتول بود. ترهالوز قند رایج همولنف حشرات با دوازده اتم کربن (متشکل از دو مولکول گلوکز) است که غلظت آن در حالت عادی در همولنف ثابت است اما در برخی حشرات زمستان گذران، به‌عنوان ترکیب محافظ سرما عمل کرده و میزان آن افزایش می‌یابد (Denlinger, 2002; Khani *et al*., 2007; Chown & Sinclair, 2010). ترهالوز از مهم‌ترین ترکیب‌هایی است که مشخص‌شده ارتباط نزدیکی با سرماسختی و دیاپوز در شفیره‌های سفیدهٔ کلم دارد (Moreau *et al*., 1981; Pullin and Bale 1989b; Pullin *et al*., 1991). در این بررسی افزایش بسیار شایان توجه و معنی‌داری در غلظت ترهالوز در سه ماه زمستان مشاهده شد ($F_{5,12}$= 14.86; P<0.001). غلظت ترهالوز در این سه ماه به بیش از ده برابر ماه‌های پیش و پس از آن افزایش یافت (شکل ۴).



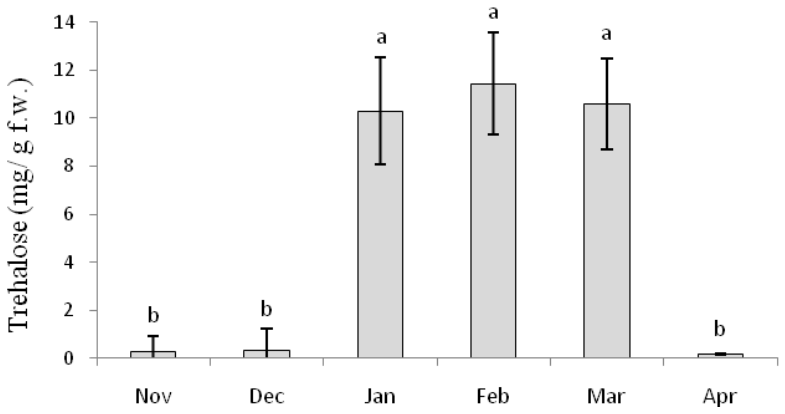
شکل ۲. تغییرات غلظت گلیکوژن و چربی کل موجود در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم جمع‌آوری‌شده از آبان ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.

Figure 2. Changes in glycogen and total lipid contents in overwintwring pupae of large cabbage white collected in Nov 2012 to April 2013. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.



شکل ۳. کروماتوگرام HPLC مربوط به جداسازی ترکیبات محافظ سرما موجود در یک شفیره زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم جمع‌آوری شده در دی ماه.

Figure 3. HPLC chromatogram of cryoprotectants separation in an overwintering sample of *P. brassicae* pupa collected in January.



شکل ۴. تغییرات غلظت ترهالوز موجود در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم جمع‌آوری شده از آبان ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.

Figure 4. Changes in trehaloe content in overwintwring pupae of large cabbage white collected in Nov 2012 to April 2013. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

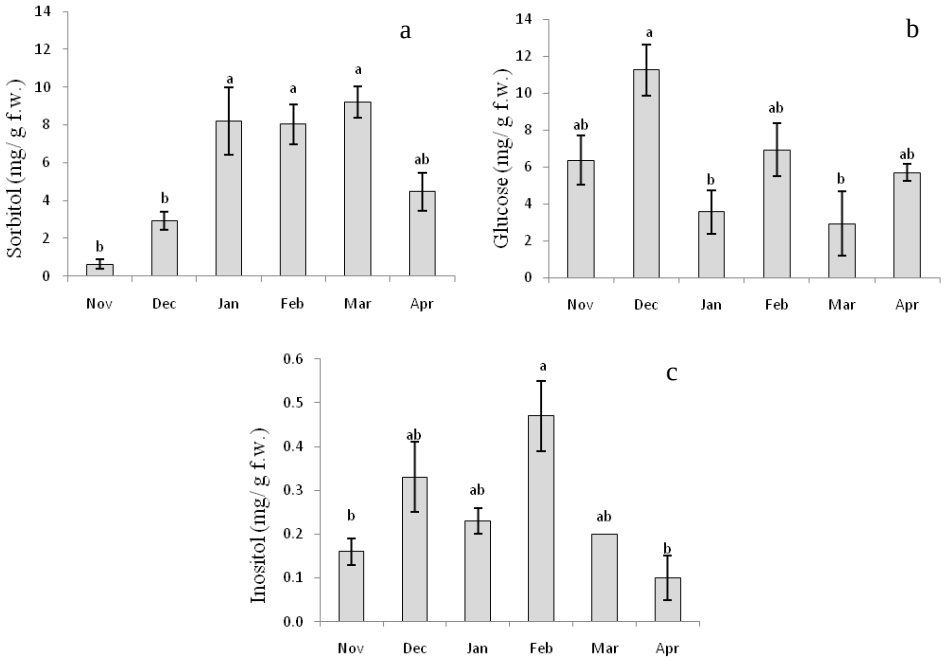
کاهش چشمگیر گلیکوژن با افزایش معنی‌دار ترهالوز همراه بود به‌طوری‌که رابطهٔ همبستگی منفی و معنی‌داری بین این دو مشاهده شد (r = -0.863; P = 0.00). در بررسی انجام‌شده روی شفیره‌های سفیدهٔ کلم با کمک گلوکز نشان‌دار ($U\text{-}^{14}C$) مشخص شد که در حشرات غیر دیاپوزی میزان گلیکوژن و ترهالوز پیش از شفیرگی به‌تدریج افزایش‌یافته اما در طول شفیرگی به‌طور معکوس روند کاهشی گذرانده و همچنین در بیشتر اوقات غلظت گلیکوژن دو برابر ترهالوز بود (Moreau *et al*., 1981). در این شفیره‌ها میزان گلوکز نشان‌دار در گلیکوژن بسیار کم بود که نشان می‌داد نقل‌وانتقال کمی در گلیکوژن رخ داده است. اما در بررسی یادشده نیز به طرز یکسانی با این بررسی میزان ترهالوز در شفیره‌های دیاپوزی افزایش یافت که با کاهش گلیکوژن همراه بود و همچنین میزان اتصال گلوکز نشان‌دار به ترهالوز و گلیکوژن در شفیره‌های دیاپوزی بسیار بالاتر بود که نشان می‌داد، این دو ترکیب در فرایند دیاپوز به‌طور فعال با هم در تغییر و تبدیل هستند. در نتایج بررسی انجام‌گرفته روی کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis*، رابطهٔ معنی‌دار و معکوسی بین گلیسرول، به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب محافظ سرما در این حشره و گلیکوژن مشاهده شد (Atapour & Moharramipour, 2009). چنین ارتباط‌هایی میان قندها به‌ویژه ترهالوز و ذخایر گلیکوژن در دورهٔ دیاپوز در حشرات دیگری نیز گزارش شده است. به‌عنوان‌مثال در حشرات کامل سرخرطومی *Lissorhoptrus oryzophylus* L. (Lee *et al*., 2002)، لاروهای شب‌پره *Plodia interpunctella* Hübner (Naeemullah & Takeda, 1998)، در شفیره‌های *Hyphantria cunea* Drury (Li *et al*., 2001) ترهالوز به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب شناسایی شد که ارتباط نزدیکی با افزایش سرماسختی و دورهٔ دیاپوز داشت و به موازات افزایش این ترکیب، ذخایر گلیکوژن دچار کاهش شده بودند. در بررسی‌های انجام‌شده در ایران افزایش ترکیب‌های محافظ سرما مانند ترهالوز و کاهش همزمان ذخایر گلیکوژن در لاروهای دیاپوزی کرم سیب *Cydia pomonella* L. (Khani *et al*., 2007)، حشرات کامل زمستان گذران سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Muller) (Soudi & Moharramipour, 2012) و یا سن گندم (Araghieh Farahani *et al*., 2014) گزارش شده است. در بررسی حامدی روی زمستان گذرانی حشرات کامل کفشدوزک شکارگر *Hippodamia variegata* نیز مشخص شد که افزایش ترکیب‌های محافظ سرما با کاهش توأم ذخایر چربی و گلیکوژن برابر است (Hamedi *et al*., 2013). هرچند در بررسی Saeidi *et al*. (2012) روی شتهٔ مومی کلم افزایش ترکیب‌هایی چون گلوکز، ترهالوز، مانیتول و مایواینوزیتول با تغییر معنی‌دار گلیکوژن همراه نبود.

همان‌طور که در شکل ۵-a نشان داده‌شده است، دومین ترکیبی که پس از ترهالوز به‌طور معنی‌داری

در سه ماه زمستان افزایش یافت سوربیتول بود ($F_{5,12}$= 11.1; P= 0.000). سوربیتول در بسیاری از حشرات زمستان‌گذران مانند *Dendroides canadensis* Leconte (Horwath & Duman, 1984)، *Ips typographus* (L.) (Kostal *et al*., 2007)، *Eurosta solidaginis* (Bale *et al*., 1989)، *Tipula trivittata* Say (Duman *et al*., 1985) و *Pyrrhocoris apterus* (Kostal *et al*., 2001) به‌عنوان ترکیب ضدیخ شناسایی شده است. به‌طورکلی به نظر می‌رسد در حشرات گلیسرول، سوربیتول و قند ترهالوز مهم‌ترین ترکیب‌های محافظ سرمای کربوهیدراتی باشند (Bale, 2002). به‌این‌ترتیب در این بررسی مشخص شد، افزون بر ترهالوز، سوربیتول در ماه‌های سرد افزایش‌یافته و به‌عنوان ترکیبی محافظ سرما به سازگاری و بقا حشره در این شرایط کمک می‌کند و بنابراین هر دو ترکیب در سازگاری این حشره با دماهای پایین اهمیت دارند.

هرچند تغییر غلظت گلوکز در ماه‌های مختلف معنی‌دار بود ($F_{5,12}$=5.08; P=0.01) اما روند مشخصی نداشت و به نظر می‌رسد به‌عنوان ترکیب محافظ سرما نقشی در زمستان گذرانی شفیره‌های سفیدهٔ بزرگ نداشته باشد (شکل b-۵). اینوزیتول نیز ترکیب دیگری بود که به‌طور معنی‌داری به‌ویژه در اواسط زمستان غلظت آن افزایش یافت ($F_{5,12}$=5.29; P=0.008) اما در بیشترین حالت نیز میزان آن کمتر از ۱mg/g f.w. بود (شکل c-۵) و لذا به‌نظر می‌رسد نقش آن در مقایسه با ترهالوز و سوربیتول در تحمل دماهای پایین کمرنگ‌تر باشد.

به‌نظر می‌رسد علت اینکه در حشرات به‌طورمعمول چندین ترکیب محافظ سرما به‌جای یک ترکیب تولید می‌شود این باشد که تولید چند ترکیب با غلظت‌های پایین‌تر خطر کمتری برای یاخته نسبت به تولید یک ترکیب با غلظت بالاتر دارد (Baust & Rojas, 1985). البته این امکان هم وجود دارد که ترکیب‌های متفاوت (حتی در مقادیر پایین) عملکرد متفاوت داشته و بنابراین به این شکل نقش ضدیخی بهتری را ایفا کنند و یا اینکه برخی از این ترکیب‌ها در مسیر ساخت (سنتز) ترکیب‌های اصلی به‌صورت حد واسط تولید شده باشند (Zachariassen, 1985).



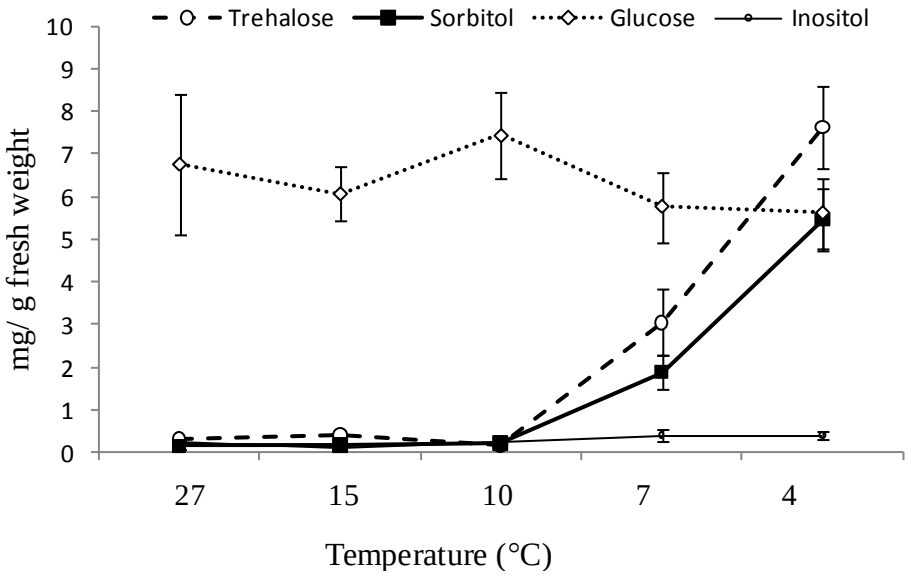
شکل ۵. تغییرات غلظت سوربیتول (الف)، گلوکز (ب) و اینوزیتول (ج) موجود در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم جمع‌آوری‌شده از آبان ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.

Figure 5. Changes in sorbitol, glucose and inositol contents in overwintwring pupae of large cabbage white collected in Nov 2012 to April 2013. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

در بررسی Moreau *et al.* (1981)، سوخت‌وساز (متابولیسم) کربوهیدرات‌های سفیدهٔ کلم در دورهٔ رشدی عادی و دیاپوزی با کمک گلوکز نشان‌دار ($U\text{-}^{14}C$) بررسی شد و ترهالوز به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب محافظ سرما شناسایی و روند تغییرپذیری‌های آن بررسی شد. در این بررسی مشخص شد که با آغاز دیاپوز میزان ترهالوز به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و کاهش چشمگیر آن با پایان گرفتن دیاپوز همراه است. این تغییر و تحول‌ها در میزان ترهالوز ارتباط معکوسی با روند تغییرپذیری گلیکوژن داشت به‌طوری‌که پیش از دیاپوز میزان گیکوژن دست‌کم دو برابر ترهالوز بود اما در طول دیاپوز کاهش و بار دیگر پس از پایان دیاپوز افزایش یافت. در شفیره‌های دیاپوزی *Sesamia nonagriodes* (Lef.) نیز پدیدهٔ همسان با این مشاهده شده است (Hilal, 1977). هرچند در بررسی Moreau *et al.* (1981) با توجه به میزان ترکیب و تبادل‌های ترهالوز و گلیکوژن، عنوان شد که ترکیب‌های محافظ سرمای دیگری به‌جز ترهالوز به‌احتمال در سرماسختی این آفت نقش دارند.

پس از آن در بررسی Pullin & Bale (1989b) تأثیر دما و دیاپوز در ساخت ترکیب‌های محافظ سرما بررسی شد و در آن مشخص شد که مهم‌ترین ترکیب محافظ سرما در شفیره‌ها سوربیتول است که افزایش آن به‌طور مشخصی با القا دیاپوز توسط دورهٔ روشنایی مرتبط است، هرچند دماهای پایین نیز سبب تشدید این پدیده می‌شوند. همچنین در این بررسی گلیسرول نیز شناسایی و بررسی شد اما به دلیل میزان پایینی که داشت عنوان شد که نقش چندانی در سرماسختی این شفیره‌ها ندارد.

بررسی‌های آزمایشگاهی نیز درستی نتایج شفیره‌های گردآوری‌شده از کشتزار را تأیید کرد. بررسی این ترکیب‌ها در شفیره‌های آزمایشگاهی که به مدت یک هفته در دماهای ۲۷، ۱۵، ۱۰، ۷ و ۴ درجهٔ سلسیوس نگه‌داشته بودند نشان داد، با کاهش دما افزایش معنی‌داری در دو ترکیب ترهالوز و سوربیتول (به ترتیب: $F_{4,25}=33.285$; $P= 0.00$ و $F_{4,25}=40.012$; $P=0.00$) رخ می‌دهد. غلظت هر دو ترکیب در سه دمای اول ناچیز بود اما به‌طور معنی‌داری (در شکل نشان داده نشده است) در دمای ۷ درجهٔ سلسیوس غلظت آن‌ها افزایش و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به رقمی همسان حشرات زمستان گذران رسید (شکل۶). تغییر گلوکز در دماهای مختلف معنی‌دار نبود و در مورد اینوزیتول نیز هرچند این اختلاف معنی‌دار ملاحظه شد ($F_{4,25}=3.315$; $P< 0.05$) اما غلظت آن به‌کلی خیلی ناچیز بود.



شکل ۶. تغییرات غلظت ترهالوز، سوربیتول، گلوکز و اینوزیتول موجود در شفیره‌های سفیده بزرگ کلم پرورش‌یافته در آزمایشگاه که یک هفته در دمای ۲۷، ۱۵، ۱۰، ۷ و ۴ درجه سلسیوس تیمار شده بودند.

Figure 6. Changes in trehalose, sorbitol, glucose and inositol contents in lab-reared pupae of large cabbage white treated 1 week at 27, 15, 10, 7 and 4 °C.

در مورد دمای تحریک‌کننده برای القا تولید ترکیب‌های محافظ سرما بررسی‌ها نشان داده‌اند که روبه‌رو شدن با دماهای پایین سبب افزایش قندها و پلی‌ال‌ها می‌شود و دمای تحریک‌کنندهٔ بیشتر در محدودهٔ ۰ تا ۵ درجهٔ سلسیوس قرار دارد هرچند در مواقعی پایین‌تر و در دامنهٔ ۰ تا ۵- درجهٔ سلسیوس است (Storey & Storey, 1988). گاهی هم یک دورهٔ گرمایی (thermoperiod) سبب تسریع این فرایند می‌شود (Kostal *et al*., 2001). نتایج به‌دست‌آمده از بررسی کنونی نشان داد که در مورد شفیره‌های سفیدهٔ بزرگ کلم، دماهای زیر ۱۰ درجهٔ سلسیوس سبب القا تولید ترکیب‌های محافظ سرما می‌شود و به‌ویژه در محدود ۴ درجهٔ سلسیوس به بیشینه می‌رسد. شاید به دلیل فعالیت این حشره در مناطق به‌نسبت معتدل (مانند گرگان)، دمای تحریک ترکیب‌ها در آن بالاتر باشد اما برای اظهارنظر قطعی در این مورد بررسی‌های تکمیلی نیاز است.

در بررسی‌های گذشته روی این حشره مشخص شده بود که چنانچه لاروهای سن ۲ یا ۳ این حشره با دوره‌های روشنایی کمتر از ۱۵ ساعت روبه‌رو شوند دیاپوزی در شفیره‌های آن‌ها القا می‌شود که حدود ۵ ماه به طول می‌انجامد (Jogar *et al*., 2005). در بررسی پیشین انجام‌شده روی این حشره (Atapour, 2016) که در ارتباط با تغییر نقطهٔ انجماد و تحمل به سرمای آفت و وضعیت دیاپوزی آن بود، مشخص شد که آغاز و پایان دیاپوز این حشره در بازهٔ زمانی آبان تا اسفندماه بوده و با توجه به کاهش معنی‌دار نقطهٔ انجماد به‌ویژه در سه ماه زمستان و عدم بقا شفیره‌ها در دماهای پایین‌تر از نقطهٔ انجماد ، مشخص شد این حشره از راهبرد گریز از یخ‌زدگی بهره می‌برد. نتایج بررسی کنونی نشان داد که در سه ماه زمستان که پایین‌ترین نقطهٔ انجماد شفیره‌ها در این زمان ثبت‌شده بیشترین افزایش در ترهالوز و سوربیتول و کاهش در گلیکوژن مشاهده می‌شود و بنابراین به نظر می‌رسد ترهالوز و سوربیتول نقش مهمی را در تحمل به سرمای این حشره در ماه‌های زمستان ایفا نماید. بررسی‌های تکمیلی بیشتر به‌ویژه روی تغییر آنزیم‌ها در این دوره، مسیرهای بیوشیمیایی این تغییرپذیری‌ها را بیشتر روشن خواهد کرد.

REFERENCES

1. Araghieh Farahani, F. Moharramipour, S. & Fathipour, Y. (2014). Changes of low molecular weight compounds of cryoprotectants in overwintering adults of *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae). *Journal Entomological of Society of Iran*, 34(1), 23-34.
2. Atapour, M. & Moharramipour, S. (2009). Changes in supercooling point and glycogen reserves in overwintering and lab-reared samples of beet armyworm, Spodoptera exigua (Lep.: Noctuidae) to determining of cold hardiness strategy.*Entomology and Phytopathology*, 78(2), 199-216.
3. Atapour, M. & Moharramipour, S. (2009). Changes of cold hardiness, supercooling capacity, and major cryoprotectants in overwintering larvae of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 38, 260-265.
4. Atapour, M. (2016). Overwintering and Cold Tolerance in Pupae of Large Cabbage White, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) in Iran. *Iranian Journal of Plant Production Science* In Press. (in Farsi)
5. Bale, J. S. (2002). Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 357(B), 849-862.
6. Bale, J. S., Hansen, T. N., Nishino, M. & Baust, J. G. (1989). Effect of cooling rate on the survival of larvae, pupariation, and adult emergence of the gallfly *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology*, 2, 285-289.
7. Baust, J. G. & Rojas, R. R. (1985). Review. Insect cold hardiness: facts and fancy. *Journal of Insect Physiology*, 31, 755-759.
8. Chino, H. (1957). Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol in the diapausing eggs of *Bombyx* silkworm. *Nature*, 180, 606-607.
9. Chown, S. L. & Sinclair, B. J. (2010). *The macrophysiology of insect cold-hardiness*. In: D. L. Denlinger and R. E. Lee, eds. Low Temperature Biology of Insects. Cambridge University Press. pp. 191-222.
10. Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, 131, 505-513.
11. Danilevskii, A. S. (1965). *Photoperiodism and seasonal development of insects*. Oliver and Boyd, Edinburg. 283 pages.

12. Danks, H. V. (2000). Dehydration in dormant insects. *Journal of Insect Physiology*, 46, 837-852.
13. Denlinger, D. L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause, In: R. E. Lee and D. L. Denlinger, (Eds.) *Insect at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York. pp. 174-198.
14. Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47, 93-122.
15. Ding, L., Li, Y. & Goto, M. (2003). Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassacae* L. during long-term cold acclimation. *Journal of Insect Physiology*, 49, 1153-1159.
16. Duman, J. G., Neven, L. G., Beals, J. M., Olson, K. O. & Castellino, F. J. (1985). Freeze tolerance adaptations, including haemolymph protein and lipoprotein ice nucleators, in larvae of the cranefly *Tipula trivittata*. *Journal of Insect Physiology*, 31, 1-9.
17. Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
18. Goto, M., Fujii, M., Suzuki, K. & Sakai, M. (1998). Factors affecting carbohydrate and free amino acid content in overwintering larvae of *Enosima leucotaeniella*. *Journal of Insect Physiology*, 44, 87-94.
19. Hamedi, N., Moharramipour, S. & Barzegar, M. (2013). Temperature dependent chemical components accumulation in *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) during overwintering. *Environmental Entomology*, 42(2), 375-80.
20. Hansen, R. G., Rutter, W. J. & Craine, E. M. (1951). A nephelometric method for the determination of glycogen. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 127-132.
21. Hilal, A. (1977). Mise en evidence d'un etat de diapause vraie chez *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera-Noctuidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*. Ser. D, 365, 367-285.
22. Horwath, K. L. & Duman, J. G. (1984). Further studies on the involvement of the circadian system in photoperiodic control of antifreeze protein production in the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Insect Physiology*, 30, 947-955.
23. Jõgar, K., Metspalu, L., Hiiesaar, K., Luik, A., Martin, A.-J., Mänd, M., Jaaniso, R. & Kuusik, A. (2005). Physiology of diapause in pupae of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Agronomy Research*, 3(1), 21-37.
24. Khani, A., Moharramipour, S. & Barzegar, M. (2007). Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *European Journal of Entomology*, 104, 385-392.
25. Khanjani, M. (2006). *Vegetable pests in Iran*. Bu-Ali Sina University Publication, 2nd Edition. 467 pp. (in Farsi)
26. Kostal, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52, 113-127.
27. Kostal, V., Slachta, M. & Simek, P. (2001). Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130(B), 365-374.
28. Kostal, V., Zahradnickova, H., Simek, P. & Zeleny, J. (2007). Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology*, 53, 580-586.
29. Lee, K., Chang, Y. & Kim, Y. (2002). Trehalose, a major cryoprotectant of the overwintering rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5, 35-41.
30. Lee, R. E. (2010). A primer on insect cold-tolerance. In: D. L. Denlinger, and R. E. Lee, (Eds). *Low Temperature Biology of Insects*. 390 pp. Cambridge University Press. pp. 3-34.
31. Li, Y. P., Goto, M., Ito, S., Sato, Y., Sasaki, K. & Goto, N. (2001). Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan. *Journal of Insect Physiology*, 47, 1181-1187.
32. Li, Y. P., Goto, M., Ito, S., Sato, Y., Sasaki, K. & Goto, N. (2001). Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan. *Journal of Insect Physiology*, 47, 1181-1187.
33. Moreau, R., Olivier, D., Gourdoux, L. & Dutrieu, J. (1981). Carbohydrate metabolism in *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera); variations during normal and diapausing development. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 68(B), 95-99.
34. Naeemullah, M. & Takeda, M. (1998). Selection for fast and slow development rates affected diapause and other developmental traits in *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Phycitidae). *Entomological Science*, 1, 503-510.
35. Pullin, A. S. & Bale, J. S. (1989a). Effects of low temperature on diapausing *Aglais urticae* and *Inachis io* (Lepidoptera: Nymphalidae): cold hardiness and overwintering survival. *Journal of Insect Physiology*, 35, 277-281.

36. Pullin, A. S. & Bale, J. S. (1989b). Influence of diapause and temperature on cryoprotectant synthesis and cold hardiness in pupae of *Pieris brassicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 94, 499-503.
37. Pullin, A. S., Bale, J. S. & Fontaine, X. L. R. (1991). Physiological aspects of diapause and cold tolerance during overwintering in *Pieris brassicae*. *Physiological Entomology*, 16, 447-456.
38. Saeidi, F., Moharramipour, S. & Barzegar, M. (2012). Seasonal patterns of cold hardiness and cryoprotectant profiles in *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 41, 1638-1643.
39. Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6, 55-74.
40. Soudi, S. & Moharramipour, S. (2012). Seasonal patterns of the thermal response in relation to sugar and polyol accumulation in overwintering adults of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Thermal Biology*, 37, 384-391.
41. Storey, K. B. & Storey, J. M. (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews*, 68, 27-84.
42. Storey, K. B. & Storey, J. M. (1991). Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee, R. E. and D. L. Denlinger, (Eds.) *Insect at Low Temperature*. New York, Chapman and Hall. pp. 64-93.
43. Worland, M. R., Grubor-Lajsic, G., & Montiel, P. O. (1998). Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *Journal of Insect Physiology*, 44, 211-219.
44. Worland, M. R., Leinaas, H. P. & Chown, S. L. (2006). Supercooling point frequency distributions in Collembola are affected by moulting. *Functional Ecology*, 20, 323-329.
45. Zachariassen, K. E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews*, 65, 799-832.