

MAGDALENA CHECHŁACZ

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ROLA CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH, NEUROENDOKRYNALNYCH I BIOCHEMICZNYCH W REGULACJI DIAPAUZY OWADÓW

DIAPAUZA JAKO STRATEGIA ADAPTACYJNA. TYPY DIAPAUZY

Zespół procesów fizjologicznych określanych jako diapauza, prowadzących do czasowego przerwania rozwoju, zatrzymania metamorfozy oraz rozmnażania się jest powszechnie stosowanym przez owady sposobem przystosowywania się do sezonowych zmian środowiska. Nie każda pora roku zapewnia taką temperaturę, wilgotność, fotoperiod czy też ilość pokarmu, która umożliwi przeżycie i wydanie następnego pokolenia, stąd konieczność cykliczności rozwoju i rozmnażania się. Sama jednak sezonowa cykliczność tych procesów dla większości owadów, a szczególnie gatunków wielopokoleniowych, jest niewystarczająca w celu osiągnięcia sukcesu rozrodczego. Diapauza jest tak istotnym zjawiskiem, ponieważ zapewnia synchronizację rozwoju i rozmnażania z optymalnymi warunkami środowiska (SAUNDERS 1992).

W ciągu całego życia owada przy przechodzeniu z jednego do następnego stadium rozwojowego są podejmowane nieodwracalne decyzje, które determinują dalszy rozwój. Z punktu widzenia cyklu rozwojowego diapauza jest jedną z opcji, która może być przez organizm wybrana lub nie. Większość gatunków owadów ma zdolność do podjęcia decyzji rozwojowej typu wejścia w diapauzę, w zależności od warunków środowiska. Model ten jest charakterystyczny dla gatunków wielopokoleniowych, u których indukcja diapauzy nie jest procesem dotyczącym wszystkich generacji i następuje wyłącznie w rozwoju pokolenia stykającego się bezpośrednio z niekorzystnymi warunkami. Zjawisko to określa się jako diapauzę fakultatywną. Istnieją też gatunki owadów dające w ciągu roku tylko jedno pokolenie, u których diapauza występuje regularnie w rozwoju niezależnie od panujących warunków środowiska. Ten typ diapauzy określa się jako obligatoryjny (CYMBOROWSKI 1984).

Diapauza może się pojawiać na etapie każdego stadium rozwojowego, stąd wyróżniamy diapauzę: embrionalną, larwalną, poczwarkową oraz imaginalną. W ramach tych czterech podstawowych kategorii istnieje ogromna różnorodność pod względem tego, w jakiej konkretnej fazie danego stadium rozwojowego odbywa się wchodzenie w diapauzę. I tak na przykład jaja mogą diapauzować począwszy od etapu wczesnej blastocysty, ale są gatunki, u których indukcja diapauzy zachodzi dopiero w fazie prawie już zakończonego rozwoju embrionalnego. Regułą jest, że u danego gatunku diapauza ma zawsze miejsce na etapie jednego, konkretnego stadium rozwojowego, a wręcz dotyczy określonej fazy tego stadium. Znane są jednak gatunki, które mogą przechodzić diapauzę w różnych momentach swego cyklu życiowego. Nie można doszukać się żadnych zależności pomiędzy typem diapauzy a pozycją systematyczną gatunku. Owady blisko ze sobą spokrewnione przechodzą diapauzę w innych fazach swego cyklu życiowego. Fakt ten pozwala przypuszczać, że diapauza jako strategia adaptacyjna mogła pojawić się w czasie ewolucji kilkakrotnie i niezależnie od siebie, a zatem jej rozprzestrzenienie wśród owadów ma charakter konwergencji. Potwierdza to brak jednolitych mechanizmów sterujących procesami wchodzenia, podtrzymywania i wychodzenia z diapauzy (DENLINGER 1985).

Czasowe zatrzymanie rozwoju, które następuje w wyniku wejścia w diapauzę jest wynikiem całego zespołu zmian fizjologicznych i biochemicznych. Owady diapauzujące charakteryzują niski poziom metabolizmu, nagromadzenie rezerw lipidów, białek, węglowodanów. Spowolnienie metabolizmu jest związane ze spadkiem aktywności większości enzymów, w tym enzymów łańcucha oddechowego. U wielu ga-

tunków owadów rozpoczęciu diapauzy towarzyszy obniżenie poziomu syntezy białek. W czasie diapauzy może też następować synteza specyficznych białek przez ciało tłuszczowe i mózg (CHIPPENDALE 1988, JOPLIN i współaut. 1990). Często są spotykane różnego typu zabezpieczenia mechaniczne, na przykład gruba warstwa kutykuli pokrywająca poczwarki, czy też chroniące przed działaniem niskiej temperatury osłony jaj, będące produktem gruczołów dodatkowych samicy. Osobniki diapauzujące mogą również dopasowywać się kolorystycznie do otoczenia, w którym zimują. W czasie jesiennych i zimowych miesięcy owady korzystają z mechanizmów zapewniających odporność na działa-

nie niskiej temperatury, polegających na akumulacji alkoholi wielowodorotlenowych (glicerol, sorbitol) i/lub węglowodanów (trehaloza, glukoza). Magazynowanie tych związków pozwala na obniżenie temperatury zamarzania hemolimfy oraz krioprotekcję struktur komórkowych (KIMURA i współaut. 1992, ROJAS i współaut. 1994). U niektórych gatunków mechanizmy zapewniające odporność na niską temperaturę są częścią programu związanego z indukcją diapauzy, natomiast u innych gatunków akumulacja alkoholi wielowodorotlenowych jest odpowiedzią na niską temperaturę, niezależną od indukcji diapauzy (DENLINGER 1985, LEE i współaut. 1988, PULLIN i BALE 1989).

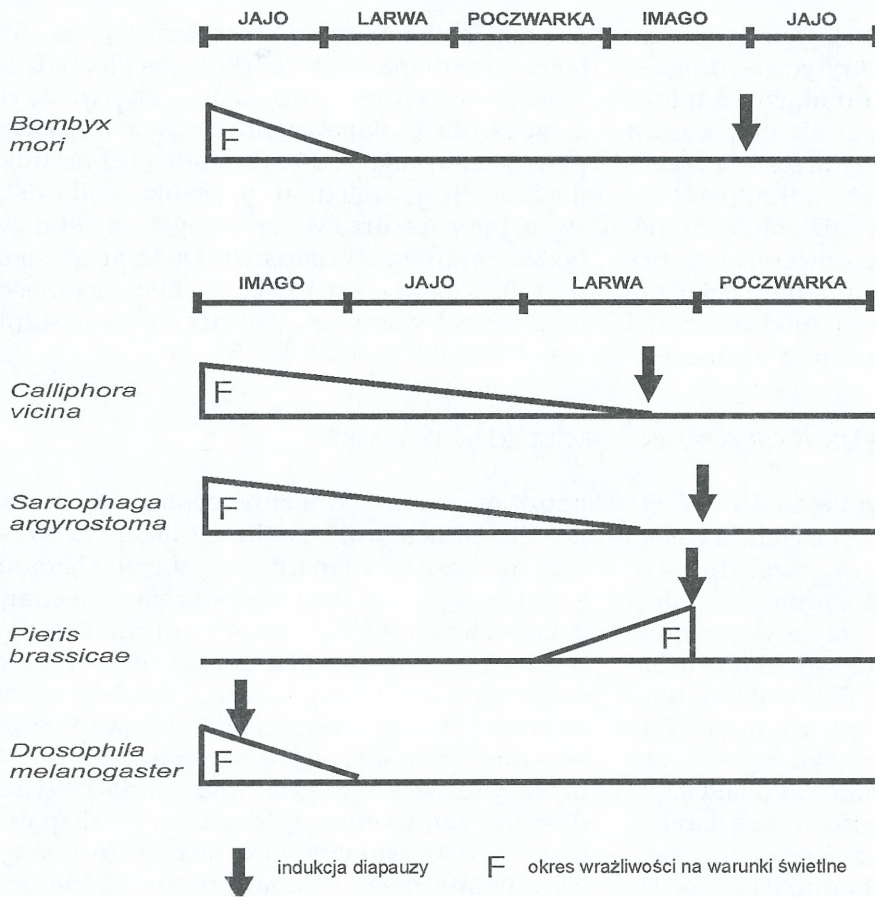
CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE INDUKUJĄCE DIAPAUZE

Istnieje ogromna różnorodność zarówno biochemicznych, fizjologicznych, jak i behawioralnych zmian adaptacyjnych, towarzyszących diapauzie, niektóre z nich mają charakter uniwersalny, inne są właściwe dla niewielkiej grupy owadów, wszystkie one jednak mają na celu umożliwienie bezpiecznego przeczekań niesprzyjających warunków środowiska. Niekorzystne dla owada zmiany otoczenia obejmują wiele różnorodnych czynników. Nie wszystkie z nich charakteryzuje jednak sezonowa cykliczność i powtarzalność zmian, a tylko takie mogą pełnić rolę wskaźników pozwalających na wchodzenie w diapauzę w odpowiedniej porze roku. Czynnikiem spełniającym kryteria induktora diapauzy jest fotoperiod, czyli liczba godzin światła przypadająca na dobę. Fotoperiod jest parametrem precyzyjnie zmieniającym się w ciągu roku, jego określona długość w warunkach naturalnych oznacza dla owadów zbliżenie się niekorzystnych zmian, a tym samym może stanowić sygnał wyzwalający właściwe mechanizmy adaptacyjne. Indukcja diapauzy może wystąpić zarówno po skróceniu, jak i wydłużeniu długości dnia. Dla każdego gatunku istnieje pewna krytyczna długość fotoperiodu, a wejście w stan diapauzy następuje poniżej (gatunki dnia długiego) lub powyżej (gatunki dnia krótkiego) tej wartości. Wyniki badań pozwalają przypuszczać, że wrażliwość na długość dnia i nocy nie występuje przez cały okres rozwoju, podatne na to działanie są tylko pewne stadia (ryc. 1.). Jeśli na przykład na fotoperiod wrażliwe są larwy, to może to obejmować okres trwania jednego stadium rozwojowego. Zdarza się też, tak jak w przypadku *Pieris brassicae*, że długość dnia oddziałuje praktycznie na osobniki wszystkich stadiów larwalnych, ale maksymalna wrażliwość przypada na ostatnie sta-

dium (SPIETH 1995). Informacja fotoperiodyczna jest zazwyczaj odbierana przez stadium rozwojowe, które wyprzedza to, które zapada w diapauzę, na przykład u *Sarcophaga crassipalpis* i *Manduca sexta* długość dnia jest rejestrowana już w czasie rozwoju embrionalnego, następnie przez larwy, natomiast poczwarka jest diapauzującym stadium (DENLINGER 1985).

Nie został jeszcze w pełni poznany mechanizm fotoperiodycznej regulacji diapauzy, nie wykluczone, że istnieje nie tylko jeden, uniwersalny model. Wiadomo jednak, że aby móc stworzyć model jakiegokolwiek systemu sterującego fotoperiodyczną indukcją diapauzy są potrzebne co najmniej cztery elementy: fotoreceptor, zegar-licznik mierzący długość fotoperiodu i liczbę cykli, system zbierania i magazynowania informacji oraz odpowiednie endokrynalne efekторы regulujące procesy wchodzenia w diapauzę a potem jej utrzymywanie i zakończenie (SAUNDERS 1992).

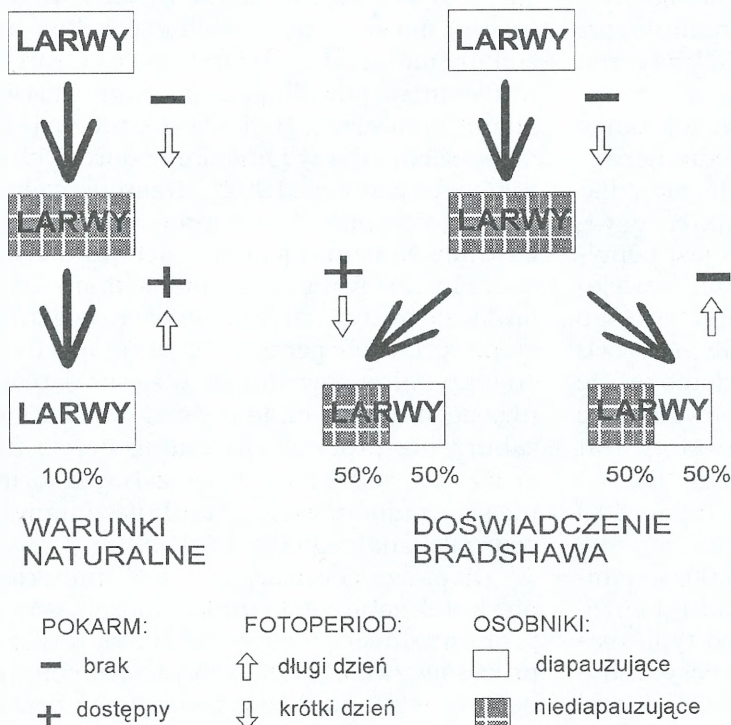
Jakkolwiek fotoperiod jest tym wskaźnikiem sezonowych zmian środowiska, który w przypadku większości owadów pozwala na właściwe planowanie rozwoju i rozmnażania się, a przy wchodzeniu w diapauzę odgrywa nadrzędną rolę, nie można jednak pominąć znaczenia dwóch innych czynników — temperatury i dostępności pokarmu. Oba te parametry charakteryzują się zmianami sezonowymi, przy czym zmiany te nie są tak precyzyjne i przewidywalne jak w przypadku fotoperiodu. Ich rola polega na modyfikowaniu krzywej odpowiedzi fotoperiodycznej. W cyklu życiowym *Chaoborus americanus* dostępność pokarmu jest czynnikiem, który współdziała z krótkim fotoperiodem w indukcji diapauzy larwalnej, a z długim w reaktywacji rozwoju (BRADSHAW 1970). U tego gatunku przezwyciężenie diapauzy wymaga warunków długiego



Ryc. 1. Zależność pomiędzy okresem wrażliwości na warunki świetlne a momentem indukcji diapauzy u różnych gatunków owadów.

dnia, co w środowisku naturalnym jest jednoznaczne z pojawieniem się pokarmu w postaci larw komarów. Kiedy w laboratorium dostarczono diapauzującym larwom *Chaoborus americanus* dużo pokarmu, to pomimo warunków krótkiego fotoperiodu zaobserwowano przerwanie diapauzy przez około 50% larw, podobny

wynik dało zastosowanie długiego fotoperiodu i głodzenia (ryc. 2.). Temperatura i długość dnia współdziałają ze sobą w inicjowaniu diapauzy (EIZAGUIRRE i współaut. 1994), a modyfikujące działanie temperatury może się przejawiać na trzy sposoby. U mszyc z gatunku *Megoura viciae* temperatura zmienia krytyczną długość fotope-



Ryc. 2. Zależność reakcji fotoperiodycznej od dostępności pokarmu w indukcji i zakończeniu diapauzy u *Chaoborus americanus*.

Opis w tekście (BRADSHAW 1970, schemat doświadczenia)

riodu indukującego diapauzę, przy wzroście temperatury o każde 5°C krytyczna długość fotoperiodu ulega skróceniu o około 15 minut (CYMBOROWSKI 1984). Jeśli jednak temperatura wzrośnie powyżej 23°C owady przestają reagować na warunki krótkiego dnia. Temperatura może zatem całkowicie znosić działanie fotoperiodu. Taki sam efekt obserwowano u *Sarcophaga argyrostoma*. Warunkami indukującymi diapauzę u tego gatunku jest 10 godzin światła i 14 godzin ciemności na dobę, przy zastosowa-

niu takiego fotoperiodu i temperatury 15–18°C poczwariki diapauzują w 100%, jeśli jednak zastosuje się tą samą długość dnia przy temperaturze 20–25°C diapauza praktycznie nie wystąpi (CYMBOROWSKI 1984). Znane są też gatunki, dla których ze względu na specyfikę środowiska życia temperatura, a nie fotoperiod, stanowi bodziec indukujący diapauzę. Do tej grupy można zaliczyć owady bytujące w stałej ciemności, na przykład w drewnie, pod ziemią oraz gatunki tropikalne (DENLINGER 1985).

NEUROHORMONALNA REGULACJA DIAPAUZY

Diapauza, będąc złożonym zespołem procesów fizjologicznych i biochemicznych, wymaga kontroli neurohormonalnej. Bez względu na to jaki czynnik bezpośrednio decyduje o indukcji diapauzy, informacja na drodze nerwowej musi dotrzeć do mózgu, stanowiąc sygnał do rozpoczęcia zmian hormonalnych. Elementami układu neuroendokrynalnego zaangażowanymi w te procesy są mózg, zwój podprzelykowy, corpora allata (CA) oraz gruczoły protorakalne (PG).

Pierwsze prace i hipotezy dotyczące diapauzy postulowały istnienie tak zwanego hormonu diapauzy (DH), substancji hamującej procesy rozwojowe i stopniowo degradującej w czasie reaktywacji rozwoju. Koncepcja ta sprawdziła się tylko w niewielu przypadkach między innymi substancję tego typu wykryto u *Bombyx mori* oraz u *Orygia antiqua*. Oba te przypadki dotyczą diapauzy embrionalnej. Indukujące diapauzę działanie długiego fotoperiodu prowadzi do wydzielania przez zwój podprzelykowy samic *Bombyx mori* hormonu diapauzy, który hamuje rozwój embrionalny składanych jaj. Na krytyczną długość fotoperiodu są wrażliwe larwy, a wydzielanie DH przez zwój podprzelykowy samic jest kontrolowane przez mózg na drodze nerwowej (YAMASHITA i HASEGAWA 1985). Hormon diapauzy jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych neuropeptydów owadzich. DH jest peptydem składającym się z 24 reszt aminokwasowych: Thr -Asp -Met -Lys -Asp -Glu -Ser -Asp -Arg -Gly -Ala -His -Ser -Glu -Arg -Gly -Ala -Leu -(Cys) -Phe -Gly -Pro -Arg -Leu. Wiadomo też, że DH oraz 4 inne neuropeptydy powstają ze wspólnego prekursora białkowego, który jest kodowany przez pojedyncze mRNA. (IMAI i współaut. 1991, SATO i współaut. 1994, XU i współaut. 1995).

Diapauza zawsze występuje jako następstwo programowych zmian układu neuroendokrynalnego, ale w zależności od typu diapauzy, a nawet gatunku owada procesy wchodzenia, podtrzymywania i wychodzenia z dia-

pauzy mogą mieć odmienne podłoże hormonalne. Nie istnieje uniwersalna substancja sterująca procesami diapauzy, a obecne badania koncentrują się przede wszystkim na mechanizmach związanych z czasowym brakiem, zbyt niskim lub zbyt wysokim poziomem podstawowych hormonów. Diapauza jest zjawiskiem rozwojowym i rzeczywiście jest też sterowana przez te same hormony, które są zaangażowane w procesy rozwoju i rozmnażania owadów. Wyniki doświadczeń wykazują, że w kontroli diapauzy biorą udział peptydy mózgowe, ekdysteroidy wytwarzane przez gruczoły protorakalne oraz hormony juvenilne produkowane przez corpora allata.

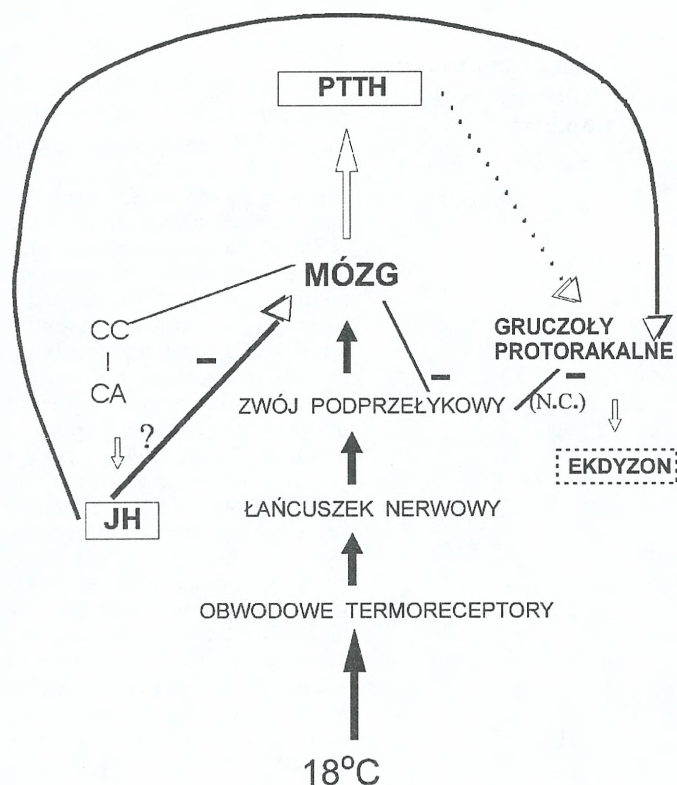
Diapauza imaginalna występuje jako następstwo obniżenia syntezy JH III (forma hormonu juvenilnego — JH o funkcji gonadotropowej) przez corpora allata, co jest wynikiem zmian w regulacji czynności wydzielniczych CA przez zegar fotoperiodyczny zlokalizowany w mózgu. Inaczej mówiąc, zmiany długości dnia lub też zmiany temperatury odgrywające rolę induktora diapauzy, powodują hamowanie aktywności allatotropowej mózgu, której skutkiem jest spadek poziomu JH w hemolimfie dorosłych osobników (SAUNDERS 1992). Następstwem tych zmian jest upośledzenie procesów związanych z rozmnażaniem u jednej z płci lub u obu równocześnie. U samic wystąpienie diapauzy przejawia się zatrzymaniem procesu oogenezy na etapie prewitellogenezy. Te same mechanizmy endokrynalne powodujące u samic zablokowanie oogenezy wywołują u samców różnego typu zaburzenia procesu spermatogenezy i funkcji gruczołów dodatkowych, co zaburza formowanie spermatoforów oraz indukują zmiany behawioru seksualnego (PENER 1992).

Diapauza poczwarkowa jest indukowana na skutek zaburzenia funkcji mózgu, gruczołów protorakalnych i corpora allata. Przerwanie procesów związanych z różnicowaniem imaginalnym występuje jako następstwo braku do-

statecznie wysokiego poziomu ekdysteroidów w hemolimfie. Zahamowanie aktywności protorakotropowej mózgu diapauzujących poczwerek, czyli brak stymulacji gruczołów protorakalnych przez mózgowe PTTH (hormon protorakotropowy), powoduje zatrzymanie uwalniania ekdyzonu. Doświadczenia *in vitro* sugerują jednak, że mechanizm regulacji diapauzy poczwarkowej ma dwojakie podłoże. W badaniach nad *Sarcophaga argyrostoma* wykazano, że z jednej strony mózg zawiera hormon protorakotropowy, ale nie uwalnia go, z drugiej zaś strony okazało się, że gruczoły protorakalne nie są wrażliwe na działanie PTTH (SAUNDERS 1992). Funkcja corpora allata i JH nie zostały jak dotąd jednoznacznie określone. Są gatunki, u których w ciągu trwania diapauzy corpora allata nie są aktywne, znane są też przypadki występowania specyficznych zmian poziomu JH w hemolimfie diapauzujących poczwerek (DENLINGER 1985). Niewykluczone, że hormon ten jest w czasie diapauzy odpowiedzialny za hamowanie wydzielania PTTH oraz spadek wrażliwości na nie gruczołów protorakalnych (WATSON i BOLLENBACHER 1988).

Diapauza larwalna może mieć różne podłoże hormonalne. U *Chilo suppressalis* i *Diatraea grandiosella* diapauzie larwalnej towarzyszy wysoki poziom JH w hemolimfie (DENLINGER 1985). Wykazano, że mózg na drodze nerwowej utrzymuje aktywność corpora allata, a produkowane przez nie JH jest odpowiedzialne zarówno za indukcję, jak i utrzymywanie diapauzy

larwalnej. Natomiast u *Ostrinia nubilalis* i *Galleria mellonella* bezpośrednią przyczyną diapauzy jest zatrzymanie syntezy ekdyzonu (GELMAN i współaut. 1992, CASSIER i CYMBOROWSKI 1993). Zahamowanie aktywności PG a tym samym powstrzymanie dalszego rozwoju przez brak ekdyzonu zachodzi na skutek braku stymulacji gruczołów przez mózgowe PTTH, którego uwalnianie jest zatrzymane. Nie wiadomo na czym polega rola JH w indukcji diapauzy u *O. nubilalis*. Zaobserwowano jednak, że w ostatnim stadium larwalnym te osobniki, które potem będą wchodzić w diapauzę charakteryzuje wyższy poziom tego hormonu w hemolimfie. Analiza ultrastruktury PG u *G. mellonella* wykazała, że brakowi aktywności syntetycznej towarzyszy redukcja szorstkiego endoplazmatycznego retikulum oraz systemu mitochondrialnego (CASSIER i CYMBOROWSKI 1993). Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za ten stan jest hamowanie aktywności gruczołów na drodze nerwowej, przecięcie *nervus cervicalis* u larw diapauzujących powoduje wzrost zawartości ekdysteroidów w hemolimfie i przerwanie diapauzy. Równocześnie brak też jest stymulacji gruczołów protorakalnych przez mózgowe PTTH. Hormon protorakotropowy jest wprawdzie syntetyzowany, ale jego uwalnianie jest blokowane w temperaturze 18°C (CASSIER i CYMBOROWSKI 1993). Diapauzujące larwy mają podwyższony poziom hormonu juwenilnego, który prawdopodobnie powoduje obniżenie wrażliwości gruczołów protorakalnych na PTTH (ryc. 3).



Ryc. 3. Model neurohormonalnej regulacji diapauzy larwalnej u *G. mellonella*.

Informacja o temperaturze otoczenia dociera z obwodowych termoreceptorów do mózgu. W niskiej temperaturze mózg na drodze nerwowej hamuje (-) gruczoły protorakalne poprzez zwój podprzełykowy i parzysty *nervus cervicalis* (N.C.). Równocześnie wysoki poziom hormonu juwenilnego (JH) hamuje uwalnianie PTTH z mózgu do hemolimfy oraz wywołuje obniżenie wrażliwości gruczołów protorakalnych na PTTH. Wysoki poziom JH utrzymuje się mimo braku (?) aktywności syntetycznej CA (wg MUSZYŃSKIEJ-PYTEL i współaut. 1993, zmodyf.).

Wysoki poziom JH jest utrzymywany pomimo braku aktywności syntetycznej corpora allata i jest zapewne rezultatem następującego w tem-

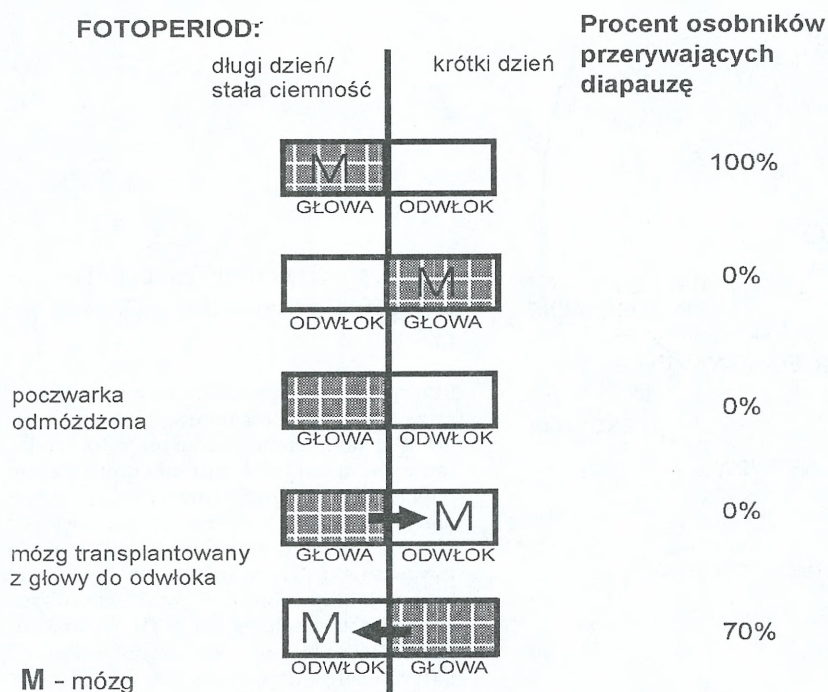
peraturze 18°C hamowania systemu odpowiedzialnego za jego degradację w hemolimfie (MUSZYŃSKA-PYTEL i współaut. 1993).

ROLA MÓZGU W REGULACJI DIAPAUZY

Mózg jako odbiorca informacji ze środowiska oraz nadrzędny ośrodek układu neuroendokrynalnego owadów, ośrodek sterujący funkcją zarówno gruczołów protorakalnych, jak i corpora allata stanowi główne centrum integracyjne kontrolujące proces diapauzy. Informacje o zmianach zachodzących w środowisku zewnętrznym są odbierane przez receptory zlokalizowane w różnych częściach ciała owada, a następnie przekazywane drogą nerwową do mózgu. Inaczej może być w przypadku rejestracji zmian długości dnia. Zasadniczo do odbioru bodźców wzrokowych służą owadom oczy złożone i przyoczniki. Wykazano jednak, że u dużej grupy gatunków fotoperiod, będący głównym czynnikiem środowiskowym pełniącym funkcję induktora diapauzy, jest parametrem rejestrowanym bezpośrednio przez mózg (ryc. 4.). Wyniki coraz większej liczby doświadczeń wskazują na pozawzrokową drogę fotorecepcji oraz na mózg jako narząd reagujący bezpośrednio na światło (WILLIAMS i ADKISSON 1964, DENLINGER 1985, SAUNDERS 1992). Dorosłe samice *Calliphora vicina* wystawione na działanie krótkiego dnia składają jaja, z których wykluwają się larwy wchodzące później w diapauzę. Usunięcie

im płatów wzrokowych oraz zniszczenie przyoczek nie pozbawia ich zdolności do odbierania bodźców fotoperiodycznych. Samice, które przeszły taką operację wystawione na działanie krótkiego dnia nadal składają jaja, z których rozwijają się później diapauzujące larwy (SAUNDERS i CYMBOROWSKI 1996). Przeprowadzone badania immunohistochemiczne u *C. vicina* z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko arretynie wykazały istnienie fotoreceptorów w różnych częściach mózgu dorosłych osobników (CYMBOROWSKI i KORF 1995). Oprócz tego że mózg pełni funkcję fotoreceptora, jest on też miejscem lokalizacji systemu zbierania, przetwarzania oraz przechowywania informacji fotoperiodycznej, a tym samym jest miejscem magazynowania programu diapauzy (DENLINGER 1985). Nie wiadomo jednak, który region mózgu jest zaangażowany w te procesy.

Elementami mózgu owadów związanymi z jego aktywnością neuroendokrynalną są komórki neurosekrecyjne (NSC). Ich funkcją jest synteza neurohormonów, które w powiązaniu z białkami nośnikowymi tworzą granule wypełniające wnętrze perykarionu. Granule neurosekrecyjne są transportowane wzdłuż aksonów



Ryc. 4. Schemat doświadczenia zastosowany w celu wykazania, że u owadów mózg jest bezpośrednio zaangażowany w odbiór informacji fotoperiodycznej ze środowiska.

Badania przeprowadzono na diapauzujących poczwarkach *Antheraea pernyi*, u których do przerwania diapauzy dochodzi w odpowiedzi na warunki długiego dnia lub stałej ciemności. Diapauzujące poczwarki umieszczano w komorach skonstruowanych tak, aby głowa i odwłok mogły być równocześnie ekspozowane na działanie przeciwnych fotoperiodów (długiego lub krótkiego dnia). W drugiej części eksperymentu przeprowadzono manipulacje chirurgiczne polegające na odmóżdżaniu poczwarek lub transplantacji mózgu z głowy do odwłoka. Stwierdzono, że diapauzę przerywają osobniki, których głowy były ekspozowane na działanie długiego dnia, o ile nie zostały pozbawione mózgu. Po transplantacji mózgu z głowy do odwłoka diapauzę przerywały osobniki, których odwłoki ekspozowano na działanie długiego dnia (WILLIAMS i ADKISSON 1964).

NSC do narządów neurohemalnych — miejsc przejściowego gromadzenia neurohormonów przed uwolnieniem do hemolimfy. Podstawowymi narządami neurohemalnymi owadów są corpora allata (CA) i corpora cardiaca (CC). Rozmieszczenie i liczba komórek neurosekrecyjnych jest cechą typową dla danego gatunku. U wszystkich owadów występują jednak cztery podstawowe grupy tych komórek: dwie grupy komórek medialnych w *pars intercerebralis* i dwie grupy komórek lateralnych w *pars lateralis*. Badania histologiczne, na przykład barwienie fuksyną paraldehydową, wskazują na cykliczne zmiany w aktywności mózgowych komórek neurosekrecyjnych u diapauzujących osobników oraz na różnice w stopniu nagromadzenia materiału neurosekrecyjnego pomiędzy osobnikami diapauzującymi i niediapauzującymi (DENLINGER 1985). Najczęściej spotykanym typem cyklicznych zmian w obrębie komórek neurosekrecyjnych jest akumulacja wybarwiającego się materiału w czasie diapauzy i znikanie go przy wychodzeniu z diapauzy. Na poziomie ultrastruktury przejawia się to akumulacją różnej wielkości granul neurosekrecyjnych, które u osobników niediapauzujących oraz na początku diapauzy występują w małych grupach przypadkowo rozmieszczonych na terenie cytoplazmy, natomiast w czasie trwania diapauzy zlewają się w duże zespoły (CASSIER i CYMBOROWSKI 1993, HARTFELDER i współaut. 1994). Zmiany te są czasami wyjaśniane w oparciu o mechanizm neurohormonalnej regulacji diapauzy, zgodnie z którym za zahamowanie rozwoju jest odpowiedzialny niski poziom ekdysteroidów w hemolimfie, następujący na skutek braku stymulacji gruczołów protorakalnych przez mózgowy PTH. Wiadomo również, że w czasie diapauzy mózg podtrzymuje syntezę PTH, natomiast jest zablokowane jego uwalnianie do hemolimfy, a tym samym mózg nie wywiera efektu tropowego na PG. Na tej podstawie procesy zachodzące w obrębie komórek neurosekrecyjnych są interpretowane jako akumulacja PTH w czasie trwania diapauzy i jego uwalnianie towarzyszące jej zakończeniu. Niestety, zaledwie u kilku

gatunków owadów umiemy wskazać komórki produkujące PTH, a ich liczba ogranicza się do zaledwie dwóch lub czterech (AGUI i współaut. 1979, MIZOGUCHI i współaut. 1990). Tymczasem cykliczne zmiany obserwowane w czasie diapauzy dotyczą znacznie większej grupy komórek i to zarówno medialnych, jak i lateralnych. Dlatego nie można sugerować, że wszystkie zmiany w komórkach neurosekrecyjnych następujące w czasie diapauzy, wykrywane metodami histologicznymi, rzeczywiście są związane z syntezą i uwalnianiem PTH. Obserwacje cyklicznej aktywności komórek neurosekrecyjnych wskazują na dynamiczną naturę diapauzy. Ich precyzyjna interpretacja nie jest jednak możliwa z powodu nie wyjaśnionej roli poszczególnych grup komórek neurosekrecyjnych oraz ze względu na udział neurohormonów w dużej liczbie różnego typu procesów metabolicznych i rozwojowych.

Ustalono, że w mózgu *Manduca sexta* źródłem PTH są dwie komórki lateralne, tak zwany L-NSC III (AGUI i współaut. 1979). Analiza L-NSC III z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazała, że w czasie diapauzy następuje nie tylko gromadzenie granul neurosekretu, ale też występują zmiany w organizacji organelli zaangażowanych w syntezę peptydów, ich sortowanie i pakowanie. Przejawia się to spadkiem zawartości kompleksów Golgiego, a wzrostem szorstkiego endoplazmatycznego retikulum. Analiza ultrastruktury L-NSC III i towarzyszących im komórek glejowych tworzących tak zwane trofospongium osobników diapauzujących i niediapauzujących wskazuje na udział komórek glejowych w uwalnianiu PTH, a tym samym ich potencjalne zaangażowanie w regulację procesu diapauzy (HARTFELDER i współaut. 1994). Komórki glejowe otaczające mózg, tworzące tak zwaną neurolemmę, stanowiącą barierę dyfuzyjną mózgu owadów mogą w czasie diapauzy, jak to było obserwowane u *Ostrinia nubilalis*, na skutek zmian na poziomie ultrastruktury stanowić barierę sekrecyjną hamującą uwalnianie PTH i/lub innych hormonów tropowych (DENLINGER 1985).

BIALKA ZWIĄZANE Z DIAPAUZĄ

Nie są znane molekularne podstawy diapauzy u owadów, należy jednak przypuszczać, że diapauzie towarzyszy ekspresja jakiś specyficznych genów. Stąd są prowadzone badania dotyczące intensywności metabolizmu białek oraz prace mające na celu określenie, czy w tym stadium rozwojowym pojawiają się typowe dla niego produkty białkowe. Diapauzę charakte-

ryzuje niski poziom syntezy białek, przy czym u różnych gatunków owadów spadek intensywności biosyntezy może być różny. Diapauzujące osobniki produkują od 10% do 50% ilości białek syntetyzowanych przez osobniki niediapauzujące. Spowolnienie metabolizmu białek ma związek ze spadkiem aktywności większości enzymów między innymi enzymów łańcucha od-

dechowego, co jest następstwem obniżenia zapotrzebowania energetycznego. Wyjątkowo wzrasta aktywność enzymów zaangażowanych w towarzyszące diapauzie mechanizmy odporności na niską temperaturę. Przykładem może być występująca u larw chrząszcza *Chilo suppressalis* podwyższona aktywność dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej, odpowiedzialnej za syntezę glicerolu, zabezpieczającego tkanki przed zamarzaniem (CHIPPENDALE 1988). Pomimo że sporo już wiadomo na temat różnic w aktywności enzymatycznej oraz hormonalnej pomiędzy osobnikami diapauzującymi i niediapauzującymi, to jednak zagadnienie wzajemnych powiązań pomiędzy zmianami biochemicznymi i neuroendokrylnymi zachodzącymi w czasie diapauzy nie zostało wyjaśnione.

Indukcja diapauzy u niektórych gatunków owadów jest związana z produkcją i akumulacją białek, które nie są wcale obecne lub są syntetyzowane na bardzo niskim poziomie u osobników niediapauzujących. Nie wiadomo, czy białka te pełnią jakąś rolę w czasie diapauzy na przykład są odpowiedzialne za utrzymywanie stanu diapauzy, czy też są tylko przechowywane i zużywane podczas reaktywacji rozwoju. Znalazienie białek specyficznych dla diapauzy oraz wyjaśnienie ich funkcji oznaczałoby możliwość zrozumienia mechanizmów regulacji metabolizmu w czasie diapauzy oraz pełniejszego wyjaśnienia procesów neuroendokrylnych, odpowiedzialnych za zatrzymanie rozwoju i metamorfozy. Obecność białek związanych z diapauzą stwierdzono w hemolimfie i ciele tłuszczowym wielu gatunków owadów przechodzących diapauzę na różnych stadiach rozwojowych: jaja (SONOBE i ODAKE 1986), larwy (DILLWITH i współaut. 1985), poczwarki (JOPLIN i współaut. 1990), imago (ICHIMORI i współaut. 1990). Do grupy białek związanych z diapauzą zalicza się zarówno białka specyficzne dla diapauzy, jak i te, które występują, choć w znacznie mniejszej ilości, także podczas normalnego rozwoju. Jednym z gatunków, w hemolimfie którego wykryto tego typu białko, jest *Cydia pomonella*, owad, który przechodzi fakultatywną diapauzę na etapie w pełni rozwiniętej larwy. Osobniki tego gatunku trzymane w warunkach indukujących diapauzę akumulują pewne białko stanowiące od 14% do 18% ogółu białek hemolimfy. Dla porównania u larw hodowanych w warunkach optymalnych ta sama frakcja białkowa stanowi zaledwie 5% wszystkich białek hemolimfy (CHIPPENDALE 1988). Znanych jest też kilka gatunków owadów, u których stwierdzono pojawianie się w czasie diapauzy

białek, nie występujących u osobników niediapauzujących. U dorosłych osobników *Gastrophysa atrocyanea* podczas trwania diapauzy zaobserwowano w hemolimfie obecność białka o masie 220 kDa, znikającego po zakończeniu diapauzy (ICHIMORI i współaut. 1990). Mózg stanowi centrum integracyjne kontrolujące procesy odpowiedzialne za zatrzymanie rozwoju i metamorfozy, stąd od strony mechanizmów regulacyjnych potencjalnie największe znaczenie poznawcze miałyby znalezienie właśnie w nim białek specyficznych dla diapauzy. Przeprowadzone badania porównawcze pomiędzy osobnikami diapauzującymi i niediapauzującymi *Sarcophaga crassipalpis* wykazały, że diapauzie poczwarkowej u tego gatunku towarzyszy nie tylko ogólne obniżenie poziomu syntezy białek, ale również zmiany w składzie białek mózgu. Wykryto, że istnieje grupa białek syntetyzowanych przez mózg normalnie rozwijających się poczwerek, których synteza jest hamowana w czasie diapauzy oraz grupa białek, których obecność stwierdzano tylko w mózgu diapauzujących osobników (JOPLIN i współaut. 1990). Wskazuje to na istnienie genów, których ekspresja zachodzi wyłącznie w czasie diapauzy. Uzyskanie niediapauzującego mutantu *Bombyx mori* (tzw. mutacja pnd) dało możliwość zbadania genetycznej kontroli biosyntezy białek w diapauzujących jajach. Wykryto osiem białek specyficznych dla diapauzy (nie występujących w jajach mutantu pnd), siedem z nich jest związanych z programem diapauzy, natomiast ósme o masie około 20 kDa pełni rolę nadrzędną, kontrolując syntezę pozostałych. Z tego względu, iż mutacja pnd dotyczy genu kodującego to właśnie białko, jej wystąpienie pociąga za sobą brak wszystkich ośmiu białek. Przypuszcza się, że białko to pośredniczy w odbieraniu sygnału o konieczności wejścia w diapauzę, nie wykluczone, że jest ono receptorem dla hormonu diapauzy (SONOBE i ODAKE 1986, SONOBE i współaut. 1986).

Odkrycie, że jakieś specyficzne produkty ekspresji genów pojawiają się podczas trwania diapauzy stwarza możliwość analizy tego zjawiska rozwojowego na poziomie badań molekularnych. Poznanie funkcji tych białek, szczególnie zrozumienie powiązania pomiędzy białkami regulującymi metabolizm diapauzujących osobników a układem neuroendokrylnym, może pozwolić w przyszłości na wyjaśnienie mechanizmu przetwarzania i wykorzystywania przez owady informacji środowiskowej w celu dopasowania cyklu życiowego do zmieniających się sezonowo warunków otoczenia.

THE ROLE OF ENVIRONMENTAL, NEUROENDOCRINAL AND BIOCHEMICAL FACTORS IN THE REGULATION OF INSECT DIAPAUSE

Summary

The annual succession of the seasons restricts the period available for active growth, reproduction or even survival of insects to only a brief portion of the year. Diapause is the physiological state characterized by the arrest of development or reproduction and is one of the most common adaptations used by insects to avoid seasonal periods of environmental stress. Diapause can occur at different developmental stages depending on the insect species. Environmental conditions such as photoperiod, temperature and the availability of food are the primary factors to determine diapause. The period of sensitivity to photoperiodic length is usually restricted to a distinct phase in a life cycle. Overwintering insects accumulate polyhydric alcohols and/or low molecular weight sugars to protect organisms from cold-related injury. Synthesis of cryopro-

tectants may be simply induced by low temperature or inherent to the diapause program. The insect's brain is not only the centre of the neuroendocrine system that coordinates the diapause response but also serves as the photoreceptor and the repository of the diapause program. There is a wide diversity in the regulatory schemes involved in controlling diapause. However, there are some common hormonal factors that regulate the initiation of diapause, such as ecdysone, PTTH and juvenile hormone. The presence of diapause unique proteins suggests that diapause is a distinct development pathway characterized by the expression of specific genes and provides the basis for the understanding of diapause regulation at the molecular level.

LITERATURA

- AGUI N., GRANGER N. A., GILBERT L. I., BOLLENBACHER W.E., 1979. *Cellular localization of the insect prothoracicotrophic hormone: in vitro assay of a single neurosecretory cell*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5694-5698.
- BRADSHAW W. E., 1970. *Interaction of food and photoperiod in the termination of larval diapause in Chaoborus americanus (Diptera Culicidae)*. Biol. Bull. 139, 476-484.
- CASSIER P., CYMBOROWSKI B., 1993. *Physiology of larval diapause in the wax moth, Galleria mellonella: An ultrastructural analysis*. Comp. Biochem. Physiol. 105A, 679-687.
- CHIPPENDALE G. M., 1988. *The role of proteins in insect diapause*. [W:] SEHNAL F., ZABŹA A., DENLINGER D. L. (red.) *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*. Wrocław Technical University Press, 331-346.
- CYMBOROWSKI B., 1984. *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa.
- CYMBOROWSKI B., KORF H. W., 1995. *Immunocytochemical demonstration of S-antigen (arrestin) in the brain of the blowfly Calliphora vicina*. Cell Tissue Res. 279, 109-114.
- DENLINGER D. L., 1985. *Hormonal control of diapause*. [W:] KERKUT G.A., GILBERT L. I. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 8, 353-412.
- DILLWITH J. W., LENTZ C. J., CHIPPENDALE G. M., 1985. *An immunochemical study of the diapause — associated protein of the southwestern corn borer, Diatraea grandiosella*. Insect Biochem. 15, 711-722.
- EIZAGUIRRE M., LOPEZ C., ASIN L., ALBAJES R., (1994). *Thermo-periodism, photoperiodism and sensitive stage in the diapause induction of Sesamia nonagrioides (Lepidoptera: Noctuide)*. J. Insect Physiol. 40, 1131-19.
- GELMAN D. B., THYAGARAJA B. S., KELLY T. J., MASLER E. P., BELL R. A., BORCOVEC A. B., 1992. *Prothoracicotrophic hormone levels in the brains of the european corn borer, Ostrinia nubilalis: diapause vs non-diapause state*. J. Insect Physiol. 38, 383-395.
- HARTFELDER K., HANTON W. K., BOLLENBACHER W. E., 1994. *Diapause-dependent changes in prothoracicotrophic hormone-producing neurons of the tobacco hornworm, Manduca sexta*. Cell Tissue Res. 277, 69-78.
- ICHIMORI T., OHTOMO R., SUZUKI K., KURIHARA M., 1990. *Specific protein related to adult diapause in the leaf beetle, Gastrophysa actrocyanea*. J. Insect Physiol. 36, 85-91.
- IMAI K., KONNO T., NAKAZAWA Y., KOMIYA T., ISOBE M., KOGA K., GOTO T., YANIGUMA T., SAKAKIBARA K., HASEGAWA K., YAAMASHITA O., 1991. *Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, Bombyx mori*. Proc. Japan. Acad. 67B, 98-101.
- JOPLIN K. H., YOCUM G. D., DENLINGER D. L., 1990. *Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of flesh fly, Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol. 36, 775-783.
- KIMURA M. T., AWSAKI T., OHTSU T., SHIMADA K., 1992. *Seasonal changes in glycogen and trehalose content in relation to winter survival of four temperature species of Drosophila*. J. Insect Physiol. 38, 871-875.
- LEE R. E. JR., DENLINGER D. L., CHEN C. P., 1988. *Insect cold-hardiness and diapause: regulatory relationship*. [W:] SEHNAL F., ZABŹA A., DENLINGER D. L. (red.) *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*. Wrocław Technical University Press, 243-262.
- MIZOGUCHI A., OKA T., KATAOKA H., NAGASAWA H., SUZUKI A., ISHIZAKI H., 1990. *Immunohistochemical localization of prothoracicotrophic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of Bombyx mori*. Develop. Growth Differ. 32, 591-598.
- MUSZYŃSKA-PYTEL M., TRZCIŃSKA R., AUBRY M., PSZCZÓŁKOWSKI M., CYMBOROWSKI B., 1993. *Regulation of prothoracic gland activity in diapausing larvae of the wax moth, Galleria mellonella L. (Lepidoptera)*. Insect Biochem. Molec. Biol. 23, 33-41.
- PENER M. P., 1992. *Environmental cues, endocrine factors and reproductive diapause in male insects*. Chronobiol. Intern. 9, 102-113.
- PULLIN A. S., BALE J. S., 1989. *Influence of diapause and temperature on cryoprotectant synthesis and cold hardiness in pupae of Pieris brassicae*. Comp. Biochem. Physiol. 94A, 499-503.
- ROJAS R. R., CHARLET L.D., LEOPOLD R. A., 1994. *Biochemistry and physiology of overwintering in the mature larva of the sunflower stem weevil, Cylindrocopturus adspersus (Coleoptera: Curculionidae) in the Northern Great Plains*. J. Insect Physiol. 40, 201-205.
- SATO Y., IKEDA M., YAMASHITA O., 1994. *Neurosecretory cells expressing gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuro-peptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, Bombyx mori*. Gen. Comp. Endocr. 96, 27-36.

- SAUNDERS D. S., 1992. *Insect seasonality: diapause, hormones, and the photoperiodic clock*. [W:] HIROSHIGE T., HONMA K. (red.) *Circadian clocks from cell to human*. Hokkaido Univ. Press, Sapporo, 21–38.
- SAUNDERS D. S., CYMBOROWSKI B., 1996. *Removal of optic lobes of adult blow flies (Calliphora vicina) leaves photoperiodic induction of larval diapause intact*. *J. Insect Physiol.* 42, 807–811.
- SONOBE H., ODAKE H., 1986. *Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, Bombyx mori. V. Identification of a pnd⁺ gene-specific protein*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 229–235.
- SONOBE H., MAOTANI K., NAKAJIMA H., 1986. *Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, Bombyx mori: Genetic control of embryogenesis*. *J. Insect Physiol.* 32, 215–220.
- SPIETH H. R., 1995. *Change in photoperiodic sensitivity during larval development of Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* 41, 77–83.
- WATSON R. D., BOLLENBACHER W.E., 1988. *Juvenile hormone regulates the steroidogenic competence of Manduca sexta prothoracic glands*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 57, 251–259.
- WILLIAMS C. M., ADKISSON P. L., 1964. *Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, Antheraea pernyi*. *Biol. Bull.* 127, 511–525.
- XU W. H., SATO Y., YAMASHITA O., 1995. *Stage dependent and temperature controlled expressions of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 270, 3804–3808.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K., 1985. *Embryonic Diapause*. [W:] KERKUT G. A., GILBERT L. I. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 1, 407434.