

# 급속내한성 유기에 의한 일본열마디개미(*Solenopsis japonica*)의 내한성 변화

박영진\* · 바탄파라스트 모하매드 · 이지은

농림축산검역본부 식물검역기술개발센터

## Cold Hardiness Change in *Solenopsis japonica* (Hymenoptera: Formicidae) by Rapid Cold Hardening

Youngjin Park\*, Mohammad Vatanparast and Jieun Lee

Plant Quarantine Technique Center, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

**ABSTRACT:** *Solenopsis japonica*, which is belonging to Formicidae in Hymenoptera, is a native ant species in Korea. However, it had not been studied for cold hardiness of *S. japonica* to understand on its overwintering mechanisms in field so far. Cold tolerance on developmental stages was measured at different cold temperature with various exposure times. Workers showed more survival at 5°C and 10°C compared with other stages and elevated cold tolerance when workers were exposed at 15°C for more than 12h incubation as a rapid cold hardening (RCH) condition. RCH treatment not only increased survival of workers at cold temperatures, but also decreased supercooling point (SCP) and freezing point (FP). RCH group increased the survival rate by 44% at 10°C compared with Non-RCH group. SCP and FP were depressed from -10.0 to -14.2°C and from -11.3 to -15.3°C, respectively, after RCH treatment. Cold temperature increased expression level of cold- and stress-related genes such as glycerol kinase and heat shock protein. These results indicate unacclimated cold tolerance of *S. japonica* and its acclimation to low temperature by RCH.

**Key words:** *Solenopsis japonica*, Cold hardiness, Rapid cold hardening, Supercooling point

**조 록:** 벌목 개미과의 일본열마디개미는 국내 토착종이다. 지금까지 야외에서 이 종의 월동기작을 이해하기 위한 내한성 연구는 진행되지 않았다. 저온에서 다양한 온도별 노출시간에 따른 발육태별 저온 저항성을 조사하였다. 성충인 일개미가 다른 발육태와 비교하여 5°C와 10°C의 저온에서 높은 생존율을 보였으며, 급속내한성 유기 조건인 15°C에서 12시간 노출 후 내한성을 획득하였다. 급속내한성 유기는 10°C에서 최대 44%까지 생존율이 향상되었으며, 체내과냉각점과 체내빙점은 각각 -10.0°C에서 -14.2°C, -11.3°C에서 -15.3°C까지 낮아졌다. 저온처리는 저온 또는 스트레스 관련 유전자인 글리세롤 인산화효소와 열충격 단백질의 발현을 증가시켰다. 이상의 결과는 일본열마디개미의 내한성이 급속내한성 유기에 의해 야기된다는 것을 의미한다.

**검색어:** 일본열마디개미, 내한성, 급속내한성, 체내과냉각점

대부분의 동물들은 저온과 같은 월동기간 야외에서의 생존율이 크게 감소하기 때문에 온대기후지역에서 살아간다(Leather et al., 1995; Rodenhouse et al., 2009; Bradshaw and Holzapfel, 2010). 이를 극복하기 위한 전략으로 휴면 생리기작을 가지지

않은 곤충의 경우 월동을 위해 따뜻한 지역으로 이주하거나 먹이조건이 갖춰진 장소에서 내한성 기작을 발휘하여 겨울을 보낼 수 있다(Danks, 2004). 따라서 곤충들은 겨울철 생존을 위해 추위와 같은 열악한 조건을 피할 수 있는 지하부를 서식처로 활용한다(Leather et al., 1995; Bale, 1996; Bale and Hayward, 2010). 이러한 서식처는 궁극적으로 월동기간중 저온노출로 인한 위협으로부터 벗어나 생명현상을 유지할 수 있게 해준다.

저온노출에 따른 곤충의 피해는 체내동결에 의한 동해와 체

\*Corresponding author: parky1127@korea.kr

Received January 6 2021; Revised February 23 2021

Accepted February 24 2021

내동결 온도 이상의 저온에서 일어나는 냉해로 나눌 수 있다 (Lee and Denlinger, 1991). 냉해는 생체의 빙점이상 온도에서 세포막의 무기능과 대사조절능력의 상실로부터 야기된다 (Quinn, 1985). 따라서 체내동결이 일어나지 않지만 낮은 저온에 의해 세포막 지질 또는 단백질의 화학적 변화로 인한 세포막 손상의 세포파괴가 유발된다(Lee et al., 2006). 동해는 빙점이 하의 온도에서 빙핵이 형성되어 세포막 파괴와 세포치사에 의해 야기되는 물리적인 대사교란을 일컫는다(Lee and Denlinger, 1991; Duman, 2001). 따라서 월동능력을 지닌 많은 곤충들은 생리적·생화학적 적응기작을 통해 0°C 이하의 온도에서 내한성을 나타내며 생명현상을 유지하고 있다(Storey, 1990).

빙점이하의 저온조건을 견딜 수 있는 곤충의 내한성은 크게 동결감수성과 동결저항성으로 구분된다. 동결감수성 곤충류는 체내 얼음형성을 견디지 못하기에 내동결물질을 체내에 축적하여 빙핵형성을 억제시키게 된다(Storey and Storey, 2012). 저온조건에 반응하여 glycogen phosphorylase의 활성을 상승시켜 글리코겐으로부터 합성되는 글리세롤이나 솔비톨과 같은 다가알코올류의 합성을 유도하여 혈림프의 빙점(supercooling point)을 낮춰 체내에 유해한 얼음형성을 막을 수 있게 해준다(Lee et al., 1987). 또한 내동결단백질도 체내빙점을 낮춰줌으로써 내한성 관련한 생리적 기능을 담당하게 된다 (Duman and Horwath, 1983). 동결저항성 곤충류는 체내동결을 막기 위한 생리현상으로 세포주변과 내부가 다량의 내동결 물질로 보호를 받아 빙핵단백질에 의한 얼음형성을 세포내부에서 외부로 국한시킨다(Storey and Storey, 1998). 이렇게 낮은 저온기간 동안 형성된 얼음벽은 세포 주변을 둘러싸게 되고 세포의 부피감소와 수분부족을 막아 세포내부를 보호할 수 있게 된다.

일본열마디개미(*Solenopsis japonica* Wheeler, 1928)는 벌목 개미과(Formicidae)의 두마디개미아과(Myrmicinae) 열마디개미속(*Solenopsis*)에 속하는 개미로 1991년에 처음으로 국내분포종으로 보고되었다(Choi and Park, 1991). 지금까지 일본열마디개미에 대한 저온관련 연구는 수행된 적이 없어 이들에 대한 내한성 및 월동 정보가 알려져 있지 않다. 그러나 같은 속에 속하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta* Buren)는 월동시 휴면태를 갖지 않는 동결감수성 곤충으로 알려져 있다 (Francke and Cokendolpher, 1986).

본 연구는 일본열마디개미의 저온감수성에 대한 기초연구로서 내한성의 정도와 기작을 밝히는 것에 목적을 두었다. 이를 위해 냉해를 일으키게 하는 체내빙점을 측정하여 냉해를 입게 되는 온도와 노출시간을 각 발육 시기별로 측정하였다. 이

렇게 해서 얻어진 각 발육 시기별 내한성은 저온에 의한 급속 내한성유기(rapid cold hardening)와 비교하였다. 또한 저온조건에서 내동결성 물질의 대사과정과 스트레스에 관여하는 유전자의 발현을 상온조건과 비교분석하여 일본열마디개미의 내한성 유기 능력의 유무와 유전적 정보를 분석했다.

## 재료 및 방법

### 시험곤충 채집 및 사육

일본열마디개미 군체는 2018년 4월 대전 만인산 일대에서 채집하였으며, 형태와 DNA 바코드 분석을 통해 동정되었다. 바코드 분석은 범용 프라이머(LCO1490과 HCO2198)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 초기변성(95°C, 5분) 1회 수행 후 변성(95°C, 10초), 프라이머 결합(50°C, 10초), 시슬연장(72°C, 20초) 과정을 30회 반복하였으며, 최종 연장(72°C, 5분)반응을 1회 수행하였다. 채집된 군체는 일반 실험실에서 2달간의 순화과정을 거쳤다. 이후 농림축산검역본부의 검역해충실험실에서 온도 28 ± 1°C, 광조건 16:8(L:D), 상대습도 60 ± 5%의 환경조건에서 누대 사육하였다. 먹이조건은 10%의 설탕물과 건조된 거저리 유충을 제공하여 사육하였다.

### 온도별 내한성 검정

다양한 저온(0, 5, 10, 15, 20, 및 25°C)에서 일본열마디개미 유충, 번데기, 및 성충을 24시간 동안 노출한 후 생존율을 조사하였다. 유충과 일개미는 25°C에서 2시간동안 순화처리 후 움직임 여부를 확인하여 자의적인 움직임이 없으면 죽은 것으로 판단하였으며, 번데기는 성충으로 우화율을 조사하였다. 처리 온도별 생존율 실험은 처리 당 10마리씩 1반복으로 구성하여, 3반복으로 진행되었다.

### 급속내한성 유기(rapid cold hardening: RCH) 효과 분석

RCH 효과를 확인하기 위한 내한성 생물검정 실험에서 일본열마디개미 일개미가 80% 생존한 15°C를 기준으로 하여 노출 시간별(3, 6, 12, 및 24시간)로 다양한 저온(0, 5, 10, 및 15°C)에서 일개미의 생존율을 조사하였다. 또한 RCH 유기전 효과는 25°C를 기준으로 하였으며, RCH 유기 효과 실험은 처리 당 10마리씩 1반복으로 구성하여, 3반복으로 진행되었다.

## 체내과냉각점(supercooling point, SCP) 및 체내빙점(freezing point, FP) 측정

체내과냉각점은 BTM-4208SD (LT Turon, Taiwan) 다중 온도감지기를 이용하여 Kim and Kim (1997)의 방법으로 측정하였으며, 체내빙점은 체내과냉각점 기준으로 일시적인 온도상승 후 감소하는 온도로 정하였다. 다중 온도감지기 끝에 일개미를 붙이고 -70°C의 초저온냉동고(GMS, Korea)에서 일본열마디개미의 체온변화를 측정하였다. 병행이 형성되면서 방출되는 발열량을 온도감지기가 감지하면서 일어나는 변화 온도점을 SCP로 기록하였다. 냉동실 내의 급속한 온도변화 속도를 줄이기 위해 스티로폼 상자를 만들어 상자 내의 온도변화 속도를 1°C/min로 낮추었다. 일개미의 SCP 측정은 10마리씩 1반복으로 구성하여, 3반복으로 진행되었다.

## 저온 관련 유전자의 발현패턴 분석

일본열마디개미의 전사체 분석은 일개미를 대상으로 수행하였으며, 각각의 온도별(9°C와 25°C)로 48시간 이상 노출된 150개체가 분석에 이용되었다. 전체 RNA 추출 전 일본열마디개미는 70% 알코올을 이용해 표면소독 후 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 추출하였다. 이후 poly-T가 붙어있는 magnetic bead를 사용하여 mRNA를 분리하였고, random primer를 이용하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 RNaseH를 처리하고, DNA 중합효소를 사용하여 이중 가닥의 DNA를 만들었다. 두 가닥의 DNA는 end repair mix를 통해 말단부위를 blunt end로 변환시킨 다음, 3' 말단에 A염기를 첨가하였다. 어댑터 서열을 이중 가닥의 DNA에 결합시키고, PCR을 DNA 절편을 증폭하였다. Illumina 기술을 이용한 차세대 염기서열 분석법을 통해 DNA 절편의 서열을 읽고 HiSeq2000을 통해 염기서열을 분석(Macrogen Inc., Seoul, Korea) 하였다. 이후 9°C와 25°C에서 글리세롤 생합성에 관여하는 glycerol kinase와 heat shock protein 유전자의 발현율을 분석하였다.

## 통계분석

생물검정 자료 결과는 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute Inc., 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균 간 비교를 실시하였다.

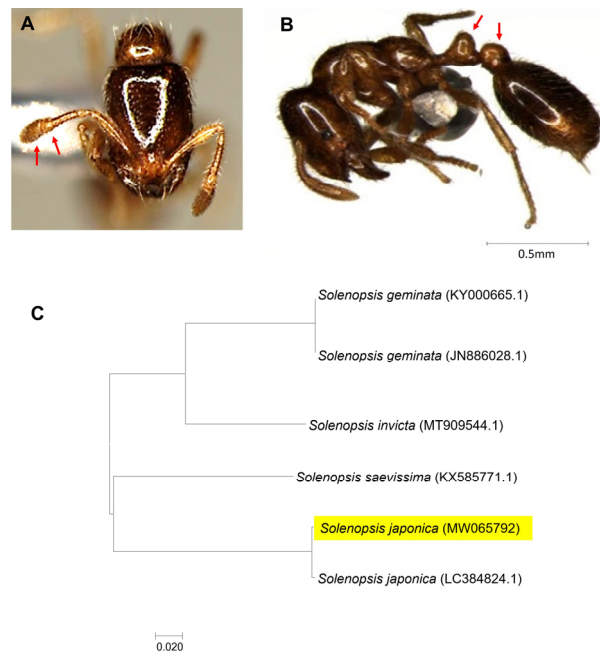
## 결과 및 고찰

### 일본열마디개미의 동정

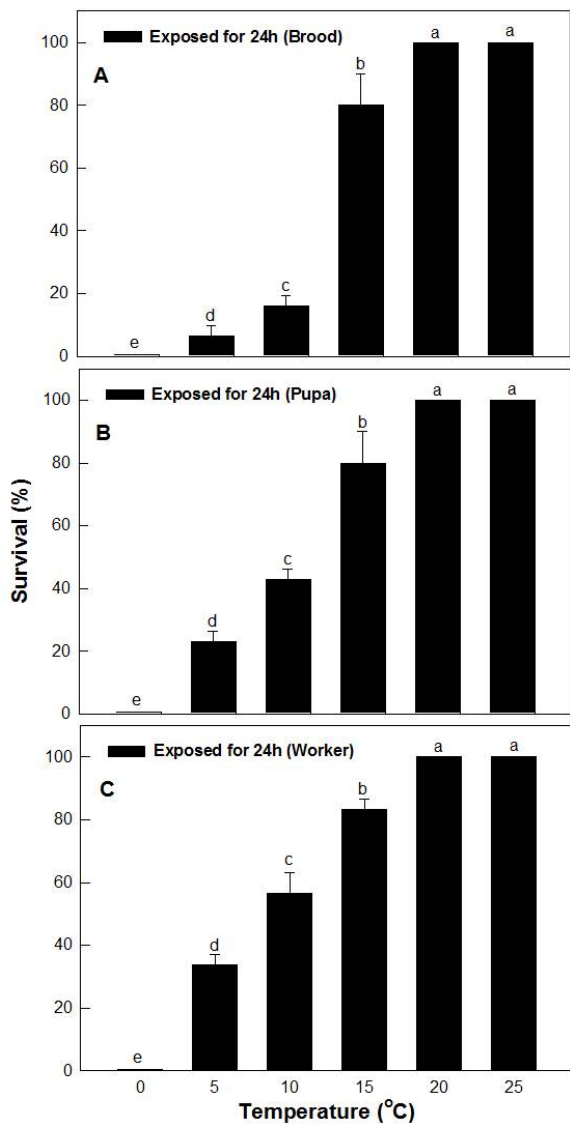
대전 만인산에서 채집된 일본열마디개미 군체가운데 일개미를 대상으로 동정이 이뤄졌다(Fig. 1). 형태적 동정에서 *Solenopsis* 속 개미류의 주요 형질인 더듬이 부위의 말단에 2개의 곤봉부(Fig. 1A)와 가슴과 배 사이에 2개의 자루마디(Fig. 1B)가 뚜렷하게 관찰되었다. DNA 바코드 분석 결과, COI 영역의 염기서열은 NCBI GenBank에 등록된 일본열마디개미와 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 1C). 분석에 사용된 658bp의 COI 염기서열은 NCBI GenBank에 등록 후 Accession No. MW065792를 부여받았다.

### 일본열마디개미의 발육태별 저온 생존율

일본열마디개미의 온도별 내한성 검정은 유충, 번데기, 및 일개미(성충)를 대상으로 측정하였다. 그 결과, 15°C 이하 또는 20°C 미만의 온도에서 각 태별 생존율 감소에 통계적으로 유의미한 차이가 확인되었다. 본 조사에서 20°C의 저온처리는 각 발육태별 생존율에 영향을 미치지 않았다( $F = 183.33$ ;  $df = 17$ ,



**Fig. 1.** An identification of *S. japonica* (Hymenoptera: Formicidae), which was collected from Mt. Manin in Daejeon, Korea. Antennal clubs (red arrows) in antenna of full-face view (A). Petioles (red arrows) in lateral view (B). Phylogenetic analysis of *S. japonica* COI gene (C).



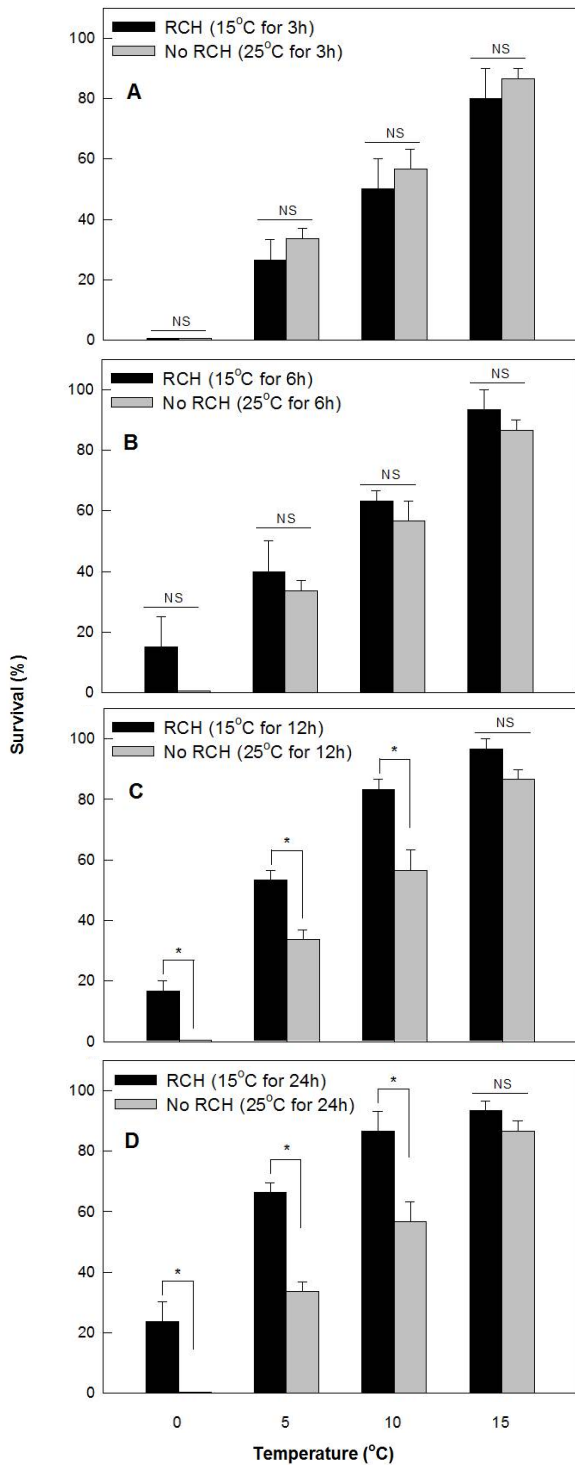
**Fig. 2.** Cold tolerance of *S. japonica* at low temperature. Survival of brood (A), pupa (B), and worker (C) for 24h when exposed at various temperatures. Each bioassay was replicated three times with 10 individuals per replication. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

36;  $P = 0.0001$ ). 그러나 10°C에서 유충 18.8%(Fig. 2A), 번데기 43.3%(Fig. 2B), 및 성충 56.6%(Fig. 2C)의 생존율이 조사되어, 본 연구에서는 성충이 다른 발육태와 비교하여 가장 높은 저온 저항성을 보였다. 이는 아르헨티나개미(*Leinipithema humile* Mayr)에서의 연구결과와 유사한 경향을 보고되었다. Abril et al. (2014)의 연구에서 18°C 이하의 저온조건은 유충의 발육에 유리하지 않았다. 그러나, 실험실 조건에서 아르헨티나개미 성충은 -4°C ~ 10.5°C까지 생존할 수 있으며(Jumbam et al., 2008), 먹이활동은 최소 5°C에서도 가능하였다(Abril et al., 2007). 본

연구에서도 일본열마디개미 성충은 5°C에서 33.3%의 생존율을 보인 반면 유충과 번데기는 10% 미만의 생존율을 보여 성충이 다른 발육태와 비교하여 저온생존에 보다 유리하였다. 그러나 본 연구에 이용된 발육태 모두 0°C에서 24시간 이상 노출 후 생존한 개체가 없어, 궁극적으로 0°C의 온도는 일본열마디개미의 생존에 유리하지 않은 것으로 확인되었다. 비록 본 연구에서는 알에 대한 조사결과가 없어 저온에 대한 감수성을 모든 발육태를 기준으로 평가할 수 없어 향후 이에 대한 추가 연구가 필요하다. 아르헨티나개미의 경우 18°C에서 모든 알들의 발육이 정지하고 100% 치사하여 다른 발육태 보다 저온에 대한 감수성이 낮은 것으로 조사되었다(Abril et al., 2014). 미국 테네시 동부지역에서 겨울기간동안 일본열마디개미와 동일한 속의 붉은불개미(*S. invicta*) 일개미를 대상으로 개체수 조사를 수행하였다. 그 결과 1.1°C 이하의 온도가 유지되는 기간 동안 최대 87.5%의 치사율이 확인되었으며(Callcott et al., 2000), 0.5°C의 기온이 7일 이상 유지되었을 때 81.4%의 치사율이 확인되었다(James et al., 2002).

#### 급속내한성 유기에 의한 일본열마디개미 일개미의 저온생존율 변화

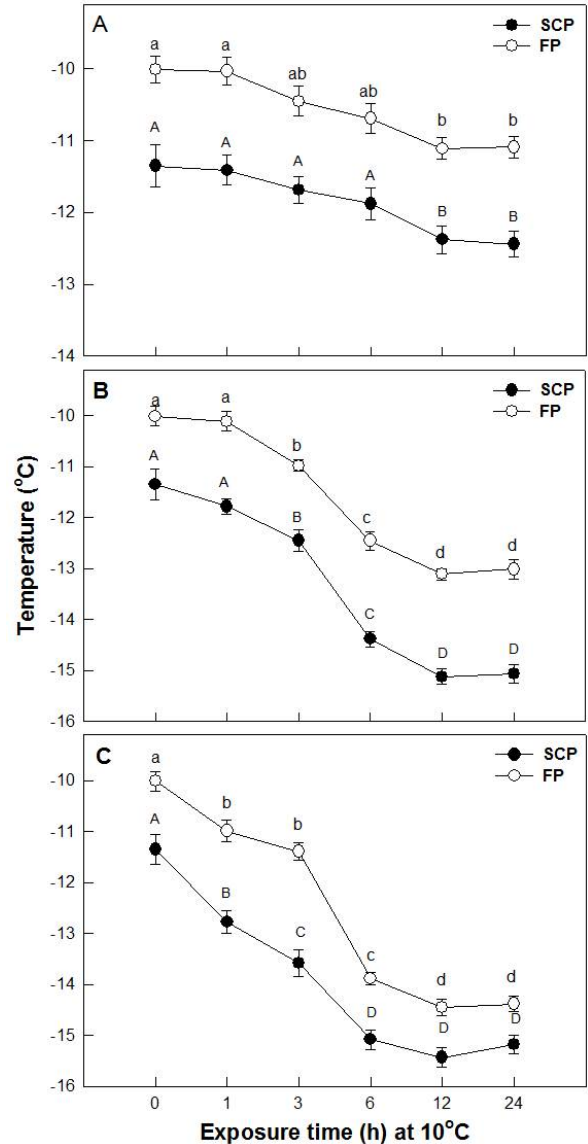
연구에서 저온처리 시 80% 이상의 생존율이 확인된 15°C (Fig. 2)를 기준으로 다양한 시간대별로 급속내한성 유기 효과를 분석하였으며, 급속내한성 유기에 따른 일개미의 생존율에 통계적인 유의차가 인정되었다( $F = 268.33$ ;  $df = 4, 91$ ;  $P = 0.0001$ ). 급속내한성 유기 시 노출시간의 증가에 따라 저온에서의 일개미 생존율이 향상되었다(Fig. 3). 15°C에서 6시간 이하의 급속내한성 유기 노출시간은 0, 5, 10, 및 15°C의 각 온도에서 일본열마디개미 일개미의 생존율 증가에 영향을 주지 않았다(Fig. 3A and B). 그러나 15°C에서 12시간 이상 노출되었을 때 0, 5, 및 10°C에서 각각 18, 20, 및 24%의 생존율이 향상되었다(Fig. 3C). 15°C에서 24시간 이상 노출 후 0°C에서 23%, 5°C에서 30% 이상의 생존율이 증가되었다(Fig. 3D). 급속내한성 유기는 저온에서 곤충의 생존율을 높이는 것으로 알려져 있다. 지금까지 개미를 대상으로 한 이와 유사한 연구결과는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 나비목의 파밤나방과 배추잠나방은 4°C에서 각각 4시간과 5시간 이상 노출 시 -10°C에서 생존율을 높였다(Park and Kim, 2013; 2014). 총채벌레목의 오이총채벌레는 4°C에서 7시간 이상 노출 시 -10°C에서 발육태별 생존율을 크게 50% 이상 높인다(Park et al., 2014). 본 연구를 통해 급속내한성 유기에 의한 저온생존율 향상이 개미에서도 관찰할 수 있었다.



**Fig. 3.** Effect of rapid cold hardening (RCH) on survival of *S. japonica* workers at various low temperatures. Survival of workers at 15°C for 3h (A), for 6h (B), for 12h (C), and for 24h (D) between RCH and No RCH treatment. Mortality was assessed at 24h after treatment. Each bioassay was replicated three times with 10 individuals per replication. Asterisk above standard deviation bars represents a significant difference on survival between RCH and No RCH treatment at each temperature at Type I error = 0.05 (LSD test). NS represents no significant difference.

### 급속내한성 유기에 의한 체내과냉각점 및 체내빙점 변화

저온조건과 온도별 노출시간이 체내과냉각점과 체내빙점의 하강에 영향을 미치는 것으로 통계적인 유의차가 인정되었다 (체내과냉각점:  $F = 767.12$ ;  $df = 17, 36$ ;  $P = 0.0001$ , 체내빙점:  $F = 241.82$ ;  $df = 17, 36$ ;  $P = 0.0001$ ). 15°C와 10°C에서 12시간 이상 노출 시 체내과냉각점은 각각 -3.6°C와 -4.0°C로 하강하



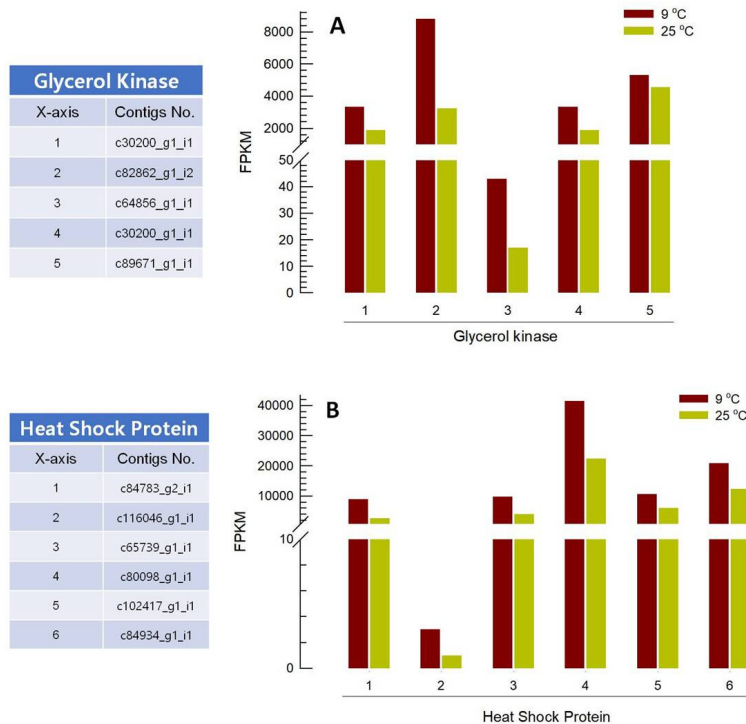
**Fig. 4.** Temporal changes in supercooling point (SCP) and freezing point (FP) of *S. japonica* worker in response to exposed time at low temperatures (10, 15, and 20°C). Survival of brood (A), pupa (B), and worker (C) for 24h when exposed at various temperatures. Each bioassay was replicated three times with 10 individuals per replication. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

였으며, 체내빙점은 각각  $-3.0^{\circ}\text{C}$ 와  $-4.2^{\circ}\text{C}$ 로 하강하였다(Fig. 4).  $20^{\circ}\text{C}$ 에서는 12시간 이상 노출 시 과냉각점과 빙점은  $-12.4^{\circ}\text{C}$ 와  $-11.1^{\circ}\text{C}$ 로 6시간 이상 노출부터  $-11.8^{\circ}\text{C}$ 의 과냉각점과  $-10.6^{\circ}\text{C}$ 의 빙점 하강이 확인되었다(Fig. 4A).  $15^{\circ}\text{C}$ 에서는 6시간 이상 노출시간부터 과냉각점과 빙점이 크게 낮아졌으며, 3시간 노출시와 비교하여  $-2.3^{\circ}\text{C}$ 와  $-1.1^{\circ}\text{C}$  이상 차이가 있었고 12시간 이상 노출 시에는  $-2.5^{\circ}\text{C}$ 와  $-2.0^{\circ}\text{C}$  이상 과냉각점과 빙점이 낮아져 저온에 보다 유리한 것을 확인하였다(Fig. 4B). 본 연구에서 가장 낮은 온도인  $10^{\circ}\text{C}$ 에서도 6시간 이상 노출 시 가장 낮은 과냉각점인  $-15.0^{\circ}\text{C}$ 였으며, 빙점은  $-13.9^{\circ}\text{C}$ 로 측정되었다(Fig. 4C). James et al. (2002)이 붉은불개미의 체내과냉각점을 측정 한 결과 붉은불개미의 개체별 크기에 따라 체내과냉각점이 다르게 조사되었으며, 머리크기가  $0.70\text{--}0.73\text{mm}$ 에 속하는 소형 개체의 경우  $-8.1^{\circ}\text{C}$ , 머리크기가  $1.27\text{--}1.40\text{mm}$ 에 속하는 대형 개체의 경우  $-6.9^{\circ}\text{C}$ 로 몸의 크기에 반비례하였다고 보고한바 있다. 본 연구에서 사용된 일본열마디개미는 몸길이가  $0.41\text{--}0.68\text{mm}$ 의 소형개체로써 체내과냉각점이 붉은불개미보다 다소 낮은 것으로 조사되었다. 아치사온도에서 노출 시간이 증가함에 따라 일본열마디개미의 저온 생존 시 세포내 빙핵형성으로 인한 세포파괴를 유발할 수 있는 체내과냉각점과 빙점을 낮춰 저온 생존에 유리하도록 생리적인 변화가 일어나는 것을 확

인할 수 있었다.

### 저온 관련 유전자의 발현패턴 분석

글리세롤 생합성에 관여하는 유전자인 glycerol kinase에 관련된 contig 5개와 스트레스 관련한 유전자인 heat shock protein에 관련된 contig 6개가 Next Generation Sequencing (NGS) 및 Differentially Expressed Gene (DEG) 분석에서 확인되었다. 또한 이들 contig들은  $25^{\circ}\text{C}$ 와 비교하여  $9^{\circ}\text{C}$ 에서 특이적으로 fragments per kilobase of exon per million (FPKM) 값이 높았다(Fig. 5). 곤충에서 glycerol kinase 유전자의 활성은 파밤나방과 배추좀나방 등 나비목의 유충에서 저온 노출 시 증가하는 것으로 보고되어 있다(Park and Kim, 2013; 2014). 따라서 본 연구를 통해 glycerol kinase 관련 유전자의 존재 가능성으로 나비목에서 잘 연구된 글리세롤 생합성 관련된 내한성 기작이 벌목에서도 존재할 것으로 판단되어 글리세롤의 생리적 기능 및 중요성을 제시한다. 또한 일본열마디개미는 저온감수성 곤충이 가지는 내한성 기작인 혈중 내동결성 물질의 농도 증가를 통한 빙핵형성 억제로 월동기간동안 저온에서의 생존을 유리하게 가져갈 것으로 판단된다.



**Fig. 5.** Fragments per kilobase of exon per million (FPKM) value on glycerol kinase (A) and heat shock protein (B) related contigs on two different temperatures, 9 and  $25^{\circ}\text{C}$ .

## 사 사

본 연구는 농림축산검역본부의 생물다양성 위협 외래생물 관리 기술개발사업인 “붉은불개미류의 분류동정, 생리·생태 및 방제법 연구(과제번호: PQ2018A006)” 과제의 지원을 받아 수행되었습니다.

## 저자 직책 & 역할

박영진: 농림축산검역본부, 농업연구사; 실험설계 및 논문 작성

바탄파라스트 모하메드: 농림축산검역본부, 전문연구원; 실험 수행

이지은: 농림축산검역본부, 전문연구원; 실험수행

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음.

## Literature Cited

- Abril, S., Oliveras J., Gómez Cl., 2007. Foraging activity and dietary spectrum of the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) in invaded natural areas of the northeast Iberian Peninsula. *Environ. Entomol.* 36, 1166-1173.
- Abril, S., Oliveras, J., Gómez C., 2014. Effect of temperature on the development and survival of the Argentine ant, *Linepithema humile*. *J. Insect Sci.* 10, 97.
- Bale, J.S., 1996. Insect cold hardiness: A matter of life and death. *Eur. J. Entomol.* 93, 369-382.
- Bale, J.S., Hayward, S.A., 2010. Insect overwintering in a changing climate. *J. Exp. Biol.* 213, 980-994.
- Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2010. Insect at not so low temperature, in: Denlinger, D.L., Lee, R.E. (Eds.), *Low temperature biology of insects*. Cambridge University Press, UK, pp. 242-275.
- Callcott, A.M.A., Oi, D.H., Collins, H.L., Williams, D.F., Lockley, T.C., 2000. Seasonal studies of an isolated red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) population in eastern Tennessee. *Environ. Entomol.* 29, 788-794.
- Choi, B.M, Park, K.S., 1991. Studies on distribution of ants (Formicidae) in Korea (6). The vegetation, the species composition and the colony density of ants in Mt. Namsan, Seoul. *Korean J. Appl. Entomol.* 30, 80-85.
- Danks, H.V., 2004. Seasonal adaptations in arctic insects. *Integr. Comp. Biol.* 44, 85-94.
- Duman, J.G., 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 327-357.
- Duman, J.G., Horwath, K.L., 1983. The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects. *Ann. Rev. Physiol.* 45, 261-270.
- Francke, O.F., Cokendolpher, J.C., 1986. Temperature tolerances of the red imported fire ant, in: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (Eds.), *Fire ants and leafcutting ant: biology and management*. Westview, Boulder, CO, pp. 104-113.
- James, S.S., Pereira, R.M., Vail, K.M., Ownley, B.H., 2002. Survival of imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) species subjected to freezing and near-freezing temperatures. *Environ. Entomol.* 31, 127-133.
- Jumbam, K.R., Jackson, S., Terblanche, J.S., McGeoch, M.A., Chown, S.L., 2008. Acclimation effects on critical and lethal thermal limits of workers of Argentine ant, *Linepithema humile*. *J. Insect Physiol.* 54, 1008-1014.
- Kim, Y., Kim N., 1997. Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 26, 1117-1123.
- Leather, S.R., Walters, K.F.A, Bale, J.S., 1995. *The ecology of insect overwintering*. Cambridge University Press, UK.
- Lee, R.E., Denlinger, D.L., 1991. *Insects at low temperature*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Lee, R.E., Chen, C.P., Denlinger, D.L., 1987. A rapid cold-hardiness process in insects. *Science* 238, 1414-1417.
- Lee, R.E., Elnitsky, M.A., Rinehart, J.P., Hayward, S.A.L., Sandro, L.H., Denlinger, D.L., 2006. Rapid cold-hardening increases the freezing tolerance of the antarctic midge *Belgica antarctica*. *J. Exp. Biol.* 209, 399-406.
- Park, Y., Kim, Y., 2013. RNA interference of glycerol biosynthesis suppresses rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Exp. Biol.* 216, 4196-4203.
- Park, Y., Kim, Y., 2014. A specific glycerol kinase induces rapid cold hardening of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Insect. Physiol.* 67, 56-63.
- Park, Y., Kim, K., Kim, Y., 2014. Rapid Cold Hardening of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Environ. Entomol.* 43, 1076-1083.
- Quinn, P.J. 1985. A lipid phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22, 128-146.
- Rodenhouse, N.L., Christenson, L.M., Parry, D., Green, L.E., 2009. Climate change effects on native fauna of northeastern forests. *Can. J. For. Res.* 39, 249-263.
- SAS Institute Inc., 1989. *SAS/STAT User's Guide*, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Storey, K.B. 1990. Biochemical adaptation for cold hardiness on insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 326, 635-654.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1998. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68, 27-84.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2012. Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. *Can. J. Zool.* 90, 456-475.