



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イラガ越冬前蛹のグリセリン Ⅰ : グリセリン生成、休眠、耐凍性に及ぼす環境温度の影響
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 29-36
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17648">https://hdl.handle.net/2115/17648</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p29-36.pdf



## イラガ越冬前蛹のグリセリン I\*

グリセリン生成, 休眠, 耐凍性に及ぼす環境温度の影響

竹原一郎 朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和36年8月受理)

### I.

前報<sup>1)</sup>で、自然状態に於けるイラガ *Monema flavescens* の越冬前蛹中のグリセリンの変化を調べ、それと耐凍性及び休眠との関係に就いて報告した。その際、夫々の条件における蚕卵及びシクロピア蚕の蛹のグリセリン含量の変化を比較し、イラガ前蛹のグリセリン量の増減は、その置かれた温度条件に非常に影響されるらしいことを述べた。今回は、その予想に基づいて、幾つかの恒温条件におかれた前蛹のグリセリン量が、どのように変化するかを測定し、同時にその時の前蛹の休眠の深さと耐凍性を調べた。

用いたイラガ前蛹は札幌産のもので、昨年同様、幼虫の間に採集、虫舎内で飼育した。マユが作られたのは8月末から9月末の約1カ月間で、昨年と殆んど同期間であった。その期間中9月4~10日頃、最も盛んにマユを作っていた。

調べた温度条件は0°C, 10°C, 20°Cの3つである。夫々の恒温箱(±1~2°C)に適量のマユを入れ、適宜取出してグリセリンを定量し、又休眠の程度と耐凍性を調べた。これらの虫は9月28日まで戸外にあったもので、この時の前蛹は少なくともマユに入って10日は経ったものを選んだ。

グリセリンの定量は前報<sup>2)</sup>と同じ方法で、2~3個体を用いて行ない、その値は生体重1g当りのmgで表わした。

休眠を調べるには上記の恒温処理中の或る時期ごとに、通常10個(時には5個)の前蛹をマユに入ったまま20°Cの恒温箱に移した。この虫の中で100日後までに外観上はつきりと変態の進行した個体は羽化に至らぬものも、すべて休眠が終了したのものとして、全体の数の百分率で休眠の程度を表わした。従ってこれは1個の虫としての休眠の深さを表わすものではなく、一定の温度条件におかれた虫の中でその時期にはどの位の割合のものが休眠を終っているかを表わす、つまり各グループの相対的な休眠の深さを表わすものである。

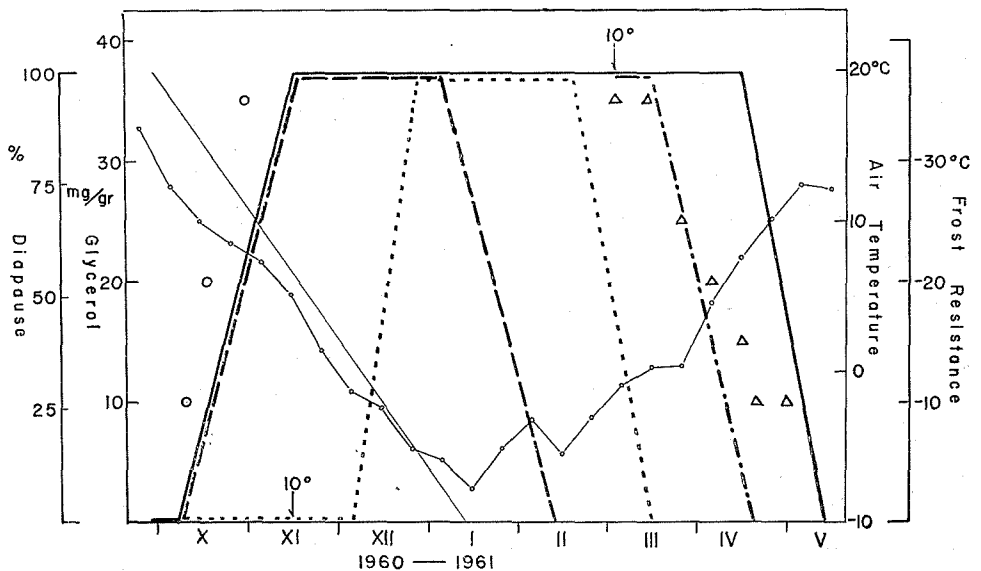
耐凍性を調べるには、やはり或る時期ごとに、通常10個(時には5個)の前蛹をマユから

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第597号

出してペトリ皿に入れ、各温度の恒温箱中で凍結させた。冷却1時間後にも過冷却の破れぬ個体は、体の表面を水で濡らして植氷した。凍結したまま同じ温度に1日おいた後、室温の空气中で融解させた。融解後少なくとも15日経って尚明らかに心臓の脈動や、虫体の動きの認められるものを生存と算えた。同一群の80%以上が生存できた凍結温度をもって、その群の耐凍性を示した。

## II.

先ず、戸外における虫体のグリセリン含量の変化について述べると、第1図に示したように、その結果は昨年とはほぼ同じで、10月に入ってグリセリンは増加し始め、11月中旬には殆んど最高値に達した。その値は平均37 mg/grであった。これは昨年に比べ約10 mg/grばかり多いが、その原因は分らない。グリコーゲンの最高値も今年のイラガは昨年に比べ、やや多く9月28日調べたものの平均値は41 mg/grであった。外気温の下では、このグリセリン量は最高値のまま4月中旬まで保たれていたが、5月10日頃には殆んど消失してしまっていた。戸外においてもこの頃になると、可成りの速さでグリセリンは消失してしまうらしい。そしてこの1カ月未満の期間に形態的な変化も急速に進む。本来休眠の終了した前蛹が変態を始める時は、先ず外部から刺戟されると体が収縮し易くなり、次いで今まで体腔内に引きこまれていた頭部が突出してくるのであるが、5月10日頃には、殆んどの前蛹がこのような状態になってしまっていた。



第1図 グリセリン、耐凍性、体眠の深さ、気温の季節的变化及び恒温処理による変化

グリセリン； —：戸外， — —：10°C， - - -：20°C→10°C， - · - ·：戸外→10°C  
耐凍性； ○：戸外， △：戸外→10°C， — — —：体眠の深さ， — ○ —：旬平均気温

次に、 $10^{\circ}\text{C}$ の恒温におかれた前蛹では、12月一杯位までは戸外の前蛹のグリセリン量と同様な変化を示した。即ち、10月から11月にかけて戸外のばあいと同じ速さで、グリセリンは増加していつて11月中頃には最高値に達する。この結果から想像して、この時期の戸外の平均気温は $10^{\circ}\text{C}$ 前後ではないかと思われたが、実際第1図に示したように、10月から11月初旬にかけて札幌地方は $10^{\circ}\text{C}$ 前後の旬平均気温で経過していた。更にそのまま $10^{\circ}\text{C}$ におかれた前蛹でも、約40~50日の間は、グリセリン量は増減せず一定に保たれた。しかしその後、戸外の前蛹とちがって、次第に減少し始め30~40日の間に殆んど消失してしまった。このようにグリセリンが無くなってしまっても、 $10^{\circ}\text{C}$ の恒温におかれたものでは、戸外の前蛹の場合のように形態上の変化は殆んど見られず、6月10日頃になっても頭部の突出した個体は認められなかった。これと同様に戸外にあった前蛹も、外気温が高くない前に(3月3日)、 $10^{\circ}\text{C}$ の恒温に移すと15日位経ってグリセリンは減少し始め、初めから $10^{\circ}\text{C}$ においた前蛹と同様に30~40日間で殆んど消失してしまった。この場合にも形態の変化は見られなかった。これに対し、初め戸外においてグリセリンが充分虫体に増加してから $20^{\circ}\text{C}$ の恒温に移されてグリセリンが消失したのでは、戸外でのばあいと同様、前述のような変態の進行を示す形態上の変化が起った。

前報<sup>2)</sup>で、 $20^{\circ}\text{C}$ の恒温におかれても、グリセリンが一時的に僅か増加するかも知れないと言ったが、今回更に調べたところでは、約50日間にわたって有意の変化は認められなかった。従ってマユに入って間もなく $20^{\circ}\text{C}$ の恒温に移された前蛹では、グリセリンは増加しないと言ってよいようである。そこでこの $20^{\circ}\text{C}$ で約50日間おいた前蛹を2群に分けて、一方を $10^{\circ}\text{C}$ 、他方を $0^{\circ}\text{C}$ の恒温に移し、グリセリン量の変化を追ってみた。先ず $10^{\circ}\text{C}$ に移したものでは、20日間も経つと急速にグリセリンは増加し始め、その後の約20日間以内に初めから $10^{\circ}\text{C}$ においた前蛹と同じ量まで達し、約50日はそのまま経過するが、その後は $10^{\circ}\text{C}$ 恒温の場合と同じく減少してしまった。一方 $0^{\circ}\text{C}$ に移したもののグリセリン量の増減は少なくとも3月初めまでは殆んど見られず、最も多いもので $0.8\text{ mg/gr}$ であった。

最初から(9月28日から) $0^{\circ}\text{C}$ の恒温においた前蛹のグリセリン量の動きについては測定値の振れが大きく、はっきりしたことは言えない。しかし3月初めまでに定量した前蛹の中、最もグリセリン量の多かったもので $3.8\text{ mg/gr}$ であったから、戸外や $10^{\circ}\text{C}$ においたものに比べると、著しい増加はないと言ってもよいようである。

次にこれらの恒温処理をした前蛹の耐凍性や休眠について述べるが、主要な結果は第1図に記入しておいた。先ず休眠は、戸外温度におかれた虫も、 $10^{\circ}\text{C}$ の恒温におかれた虫も全く同様に、9月28日から1月末までの約4カ月の間に、すべてそれから覚めてしまった。ところが $20^{\circ}\text{C}$ におかれた虫では150日経っても1個体も休眠から覚めず、すべてのものが永久前蛹<sup>3)</sup>の形になった。 $20^{\circ}\text{C}$ に50日おいてから、 $10^{\circ}\text{C}$ に移した虫では約2カ月半の間にすべての虫が急速に休眠から覚めてしまった(第1表)。 $0^{\circ}\text{C}$ におかれた虫では、休眠の覚め方は極めてのろく、100日以上経つと初めて30%内外のものが休眠状態から脱した。 $20^{\circ}\text{C}$ から $0^{\circ}\text{C}$ に移した場合

第 1 表 20°C, 50 日処理後 10°C に移した前蛹のグリセリン  
含量と休眠及び耐凍性との関係

	1960 年				1961 年		
	11月15日	12月14日	12月19日	12月27日	2月1日	2月17日	2月28日
10°C 処理の日数 (日)	0	29	34	42	78	94	105
グリセリン含量*(mg/gr)	0	4.2, 4.9	—	35.0, 42.0	30.0, 33.0	39.0, 40.0	—
休眠の深さ*** (%)	100	—	40	—	0	0	0
耐凍度****	-10°C	—	-30°C	—	-35°C	—	-35°C

\* 各数値毎にそれぞれ前蛹 2~3 個体をいっしょにすりつぶして定量。

\*\*\* 20°C に 100 日おいた時変態の進行が認められないものの百分率。

\*\*\*\* この温度に凍結状態で 1 日放置後, 80% 以上が生存できた温度。

も同様で 0°C で 100 日以上経つと 40% の虫が休眠から覚めた。

これらの虫の耐凍性を見ると, 戸外のものとは 10°C の恒温処理のものでは, 全く同様に耐凍性が高まって行く。即ち実験開始の 9 月 28 日において -10°C 程度であったものが, 10 月中旬には -20°C に, 11 月 1 日には -35°C に耐えるようになった(第 1 図)。前報<sup>9)</sup>で明らかにしたように, このイラガ越冬前蛹が -30°C の凍結に耐えられるばあいには約 -183°C においても凍結のまま生存が可能なので, 恐らく今回の場合も 10 月下旬には\*, そして 10°C の恒温では 1 カ月以内に彼等の耐凍性は既にその極点まで達していたと思われる。一方 20°C の恒温では虫体の耐凍性は常に最初と変わらず, 永久前蛹の形の虫はいつも -10°C 程度の耐凍度を保っていた。20°C で約 50 日経った時 10°C に移した場合は, 先の 10°C 恒温処理の場合と同様に, 10°C に入れてから 1 カ月後虫体の耐凍度は -30°C を越えた(第 1 表)。初めから 0°C の恒温においた場合は最初のうちは虫体の耐凍性に変化が見られないが, 130 日及び 150 日後に調べた時には, 耐凍度は -5°C に低下していた。しかし今回の実験では 100 日以上 0°C におくと次第に死ぬものが増加しているのでこの結果は再検討を要すると思われる\*\*。

戸外の温度では上記のように 10 月下旬には前蛹の耐凍性は最高に達していると考えられるが, これは翌春までこの状態に保たれていて, 平均気温が 10°C を越える 4 月末~5 月初め頃に再び低下するらしい<sup>9)</sup>。1961 年の結果では, 3 月中の前蛹は -35°C にも耐える最高の耐凍性を示していたが, 5 月 10 日には殆んど最低となり, ようやく -5°C に耐えられる程度であった。前述したように戸外に放置した場合には日中の気温上昇の影響で, マユ内の前蛹には変態の進行が非常に明らかに認められ, 5 月 10 日には頭部の突出した蛹化直前の状態になっていた。そこで虫体内でのこのような変態の進行による耐凍性の低下と, グリセリン含量の変化に伴うそれとをなるべく区別するために, 戸外保存の前蛹を 1961 年 3 月 3 日に 10°C の恒温に移したもので耐凍性の変化を細かく追ってみた。なお 10°C の恒温においては前蛹の変態の進行

\* 1958 年には 10 月末には殆んど前蛹が -30°C の予備凍結後液体酸素の温度に耐えた。

\*\* 1951 年 2 月から 0°C においた前蛹は 354 日後においてもその 80% が生存しており, その後半数が変態を完了した。

第2表 グリセリン生成後戸外から10°Cに移した前蛹の  
グリセリン含量と耐凍性との関係

	1961年						
	3月3日	3月14日	3月25日	4月5日	4月15日	4月20日	4月24日
10°C 処理の日数 (日)	0	11	22	33	43	48	52
グリセリン含量*(mg/gr)	35.0, 41.0	35.0, 40.0	23.5, 26.0	12.0, 18.0	3.0, 4.0	—	—
耐凍度***	-35°C	-35°C	-25°C	-20°C	-15°C	-10°C	-10°C

\* 各数値毎にそれぞれ前蛹 2~3 個体をいっしょにすりつぶして定量。

\*\*\* この温度に凍結状態で1日放置後、80%以上が生存できた温度。

は極めてのろく、5カ月以上経つと初めて頭部の突出した状態に達する。この結果は第2表及び第1図に示したように虫体のグリセリン含量が低下すると同時に、極めて明らかに耐凍性も下って行く。グリセリンが体内から殆んど消失する4月20日には虫体の耐凍度は-10°Cに達し、それ以後は当分の間\* 変化しない。秋のうちに初めから10°Cの恒温においた前蛹の場合もグリセリン消失に伴う耐凍性の低下は殆んど同様であって、グリセリン量が減り始めるまでは最高の耐凍性を保っていたが、グリセリンが消失した2月下旬には-15°C1日の凍結で約40%の虫が凍死し、-10°Cでは全部が生存できた。この場合にも前蛹の変態の程度は頭部突出以前の状態に止まっていた。

### III.

以上の結果からみれば、イラガ越冬前蛹の体内でのグリセリン生成のためには10°Cが最適温度のようである。戸外においた前蛹の場合から考えて、恐らく10°Cを中心とした数度の温度範囲では、グリセリンは急速に生成されるらしいが、少なくとも20°Cでは全く生成されず、又0°Cでは生成されるようだが極く少量に過ぎない。

札幌においては戸外の前蛹のグリセリン含量は11月頃から最高値に達し、4月半ば頃までは変わらず、以後急減してほぼ1カ月間に消失してしまう。9月末から10°Cの恒温におかれた前蛹では、グリセリンの生成は戸外のものと同じ速度で起っているが、これは10°Cの恒温に虫を移した時期がこのような結果を招いた一つの要素になっていると思われる。20°Cの恒温で50日処理してから10°Cに移した虫では、グリセリンの生成速度ははるかに速いように見える。10°Cの恒温処理による結果で最も興味深いことは、この温度にそのままおかれると、一度最高値まで増した前蛹体内のグリセリンが50日程経つと減り始め、遂には消失してしまう事実である。前記の戸外におかれた前蛹の場合には、グリセリンが十分に増量した頃には既に気温は0°C附近に達し、以後翌春再び気温が昇って10°C附近になるまでグリセリンの減少は始まらない。前報<sup>1)</sup>で明らかにしたように、グリセリンの減少は虫体内でのグリコーゲンの増加と考えるとよからう。従って上記の結果はグリセリン→グリコーゲンの変化が前蛹に起る為にも10°C附近又はそれ以上の温度が必要なることを示すものである。ここで問題になるのは、このよ

\* 頭部突出の時期までは-10°C1日の凍結に耐える。

うな変化は温度が 10°C 附近又はそれ以上になることだけでは、直ぐに始まらないことである。3 月初め既に完全に休眠を終っている前蛹を 10°C に移した時も少なくとも 10 日以上経たなければグリセリンの減少は始まらない。従ってグリセリン→グリコーゲンの変化が起るに先立って、0°C では起らないが 10°C 以上だと進行する何等かの過程が前蛹の体内で起っていると考えられる。又 20°C の恒温処理をした前蛹を 10°C に移した時、グリセリンの生成は直ぐには起らず、約 15~20 日位経ってから生成され始めるらしいことは、10°C 附近だと進行できる何等かの過程が虫体内でグリコーゲン→グリセリンの変化に先行することを思わせる。

イラガ前蛹におけるグリセリン生成は、必ずその休眠終了の過程に伴って起るものらしい。20°C の恒温では前蛹のグリセリンは全く生成されないが、この温度では前蛹の形態も又全く不変で休眠状態のまま 1 年以上も生存出来る<sup>3)</sup>。戸外においた場合も、10°C 恒温の場合も、グリセリンが明らかに増加し始めた時期には、既に休眠を終った前蛹が必ず幾つかは現われている。そしてすべての前蛹が休眠から覚めてしまった時期には、常にそのグリセリン含量は最高に達している。又 20°C から 10°C に移した前蛹のグリセリン生成速度が、戸外にそのままおかれた場合よりも速いことは既に述べたが、この時の休眠も 10°C に移してから僅か 2.5 カ月以内にすべて終了してしまうので(第 1 表)、戸外では少なくとも 3.5 カ月かかっている(第 1 図)ことと比較すると、はるかに速く進行していることが分る。今回の実験中、このような関係がはっきり現われない唯一の例は 0°C の恒温に前蛹をおいた場合である。しかし 100 日以上 0°C においた前蛹では休眠の覚めたものが 30% 内外は現われてくるから、少なくとも一部の虫の体内では非常にゆっくりと休眠終了への過程は進んでいるものらしい。この間において体内のグリセリンの増加は 10°C 処理の場合に比べると殆んど問題にならないが、全く生成されないのではなく、極く少数の前蛹は最大で 3.8 mg/gr に達する程度のグリセリン含量を示している。恐らくはこの処理で休眠の覚めるような前蛹の体内では、グリセリンの生成も極くゆるやかに進行しているのであろう。このようにグリセリンの生成と休眠終了との過程が同一の最適温度をもつ例は、他のグリセリンを持った昆虫では認められていない。蚕卵<sup>6)</sup>やシクロピア蚕の蛹<sup>7)</sup>では 25°C の恒温状態でグリコーゲン→グリセリンの変化が殆んど完了しても、未だその休眠は破れていない。

虫体の耐凍性とグリセリン含量との関係は、耐凍度が -10°C 以上の前蛹の場合にはグリセリンの増加は耐凍性の増大を伴うように見える。即ち 20°C 又は 0°C の恒温におかれた虫体では耐凍性の向上はなく、同時にグリセリンの著しい増加もない。20°C では、前蛹は長期にわたって耐凍性が変わらず常に -10°C 程度の凍結に耐えるが、これを 10°C に移してその体内にグリセリンの生成が始まると、1 カ月位のうちに -30°C でも凍死しなくなる。しかし先に述べたように、イラガの耐凍度が -30°C をこえると、もはや虫体は超低温にも耐えられる事実から、グリセリン含量が 20 mg/gr 余りに達した後ではそれ以上のグリセリン増加は耐凍性を更に高める意味はなくなるように見える。言換えると、グリセリン含量が 2% 程度になった時にはイラガ前蛹の耐凍性はもはや最高に達しているのであろう。グリセリン消失の際には、まだ前蛹

が 25 mg/gr 内外のグリセリンをもっているうちに既に耐凍性の低下がおこってくるように見えるが(第2表), もしそうだとすればグリセリン生成期とその消失期とで前蛹の組織細胞の原形質の状態が同じでないことも考えられる。しかし今回の方法では同一個体で耐凍性とグリセリン含量を調べていないので, これらの関係は更に検討を要する問題である。

以上の結果は何れもわれわれが前報<sup>9)</sup>で述べたグリセリンの耐凍性に対する役割の説明を支持するに思われる。即ち越冬昆虫の耐凍性は恐らくその組織細胞の原形質の状態変化によって或る程度(例えばイラガ前蛹では  $-10^{\circ}\text{C}$  1 日程度)までは増加出来るもので, このような状態変化が起った昆虫ではグリセリン含量の増大はその凍結に際しての細胞からの脱水や細胞内外における溶質の濃縮をおさえる意味で有利であるにちがいない。

### 摘 要

イラガ越冬前蛹をいろいろな温度において, その体内のグリセリン含量がどのように変化するか, 又それに伴って休眠や耐凍性が変るかどうかを調べた。

グリセリン生成には  $10^{\circ}\text{C}$  内外の温度が必要で,  $20^{\circ}\text{C}$  では全くできず,  $0^{\circ}\text{C}$  では一部の虫だけに極く少量のグリセリンが検出された。 $10^{\circ}\text{C}$  では一旦体内にできたグリセリンは約2カ月はそのままの最高含量を保っているが, それ以後は急速に減り始め1カ月余りの間に消失する。グリセリン消失の過程が速やかに体内で進行するためにも  $10^{\circ}\text{C}$  附近又はそれ以上の温度が必要である。

グリセリンの生成は前蛹の休眠終了の過程に伴って起る。又虫体の耐凍性は, グリセリンが生成される以前に既に  $-10^{\circ}\text{C}$  で1日の凍結に耐える程度に達しており, 以後はグリセリン含量の増加に伴って高まるが, グリセリン量が体重の2%程度になった時には既に最高に達し超低温に冷却されても凍死しない。グリセリンが減り始めると前蛹の耐凍性もそれに従って低下して行くが, 蛹化の変態が著しく進むまでは, たとえ体内からグリセリンが消失してしまっても,  $-10^{\circ}\text{C}$  1日程度の凍結には耐えることができる。

### 追 記

### イラガの学名について

イラガの属名は本来 *Monema* Walker 1855<sup>1)</sup> であるが, 同じ名 (*Monema* Greville 1829) が他の生物にすでに命名されているため, イラガには改めて *Cnidocampa* 1905 という新属名があたえられ<sup>2)</sup>, われわれもこれを使用して来た。しかし最近 (1954) 筆者等の報文の一つにおいて<sup>3)</sup> 編輯者 Dr. Hall が指摘したようにこれは誤りであることがわかった。すなわち原典<sup>4)</sup> によれば *Monema* Greville は硅藻につけられた属名であった。従って筆者等も今後はイラガの学

1) List. Spec. Lepidopt. Ins. in Brit. Mus., **5**, 1112.

2) Dyer, 1905. Proc. U. S. Nat. Mus., **28**, 952.

3) Bull. Ent. Res., **45**, 329.

4) Greville, Scottish Cryptogamic Flora, **6**, Synopsis 38.

名として *Monema flavescens* Walker を採用することにする。

この問題についてお教え下さった W. E. China, 井上寛, 朝比奈正二郎の諸博士に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 イラガ越冬前蛹のグリセリン (予報). 低温科学, 生物篇, **18**, 51-56.
- 2) 竹原一郎・朝比奈英三 1959 越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて. 低温科学, 生物篇, **17**, 159-163.
- 3) Asahina, E. 1959 Diapause and frost-resistance in a slug caterpillar. Kontyû, **27**, 47-55.
- 4) 朝比奈英三・青木廉 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法. 低温科学, 生物篇, **16**, 55-64.
- 5) Asahina, E., Aoki, K. and Shinozaki, J. 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. Bull. Ent. Res., **45**, 329-339.
- 6) Chino, H. 1958 Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Combyx mori*. II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. Ins. Physiol., **2**, 1-12.
- 7) Wyatt, G. R. and Meyer, W. L. 1959 The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol. J. Gen. Physiol., **42**, 1005-1011.
- 8) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 昆虫の耐凍性とグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 57-65.

#### Résumé

In prepupae of a slug moth, *Monema flavescens*, reared at various graded temperatures the changes of glycerol content were examined in connection with diapause and frost-resistance.

One of the most important factors to control the glycerol metabolism was found to be temperature (see Fig. 1). A temperature of 10°C seems probably to be optimum for causing rapidly increasing glycerol in the prepupa. At 20°C glycerol was never formed in any insects, while at 0°C only a few individuals were found to form a small amount of glycerol. At a constant temperature of 10°C, the glycerol content after it had reached a maximum, say 3 or 4% of fresh body weight, remained at almost a constant level for about two months, and then it suddenly decreased. On the other hand, the prepupae reared under outdoor conditions, in which glycerol had remarkably increased during autumn, kept their high glycerol content throughout the five months cold season when the mean atmospheric temperature continuously remained below 10°C. In such a case incubation at a temperature of 10°C or 20°C always resulted in a rapid decrease in their glycerol content.

An appreciable amount of glycerol increase in these insects was, as a rule, accompanied by the termination of their diapause. Besides, a clear parallelism between glycerol content and the degree of frostresistance in these insects was found within a limited range of the latter. Before glycerol formation the prepupae could survive freezing at -10°C without any glycerol in their body regardless of the temperature at which they had been kept. This was also the case of the insects in which glycerol once formed had already disappeared, unless the morphogenesis for pupation had remarkably advanced in their body. In addition, an increase in glycerol content seems to be needless for the insects in maintaining their high frost-resistance after the content has reached about 2%, when they become so resistant that they can survive freezing even at a super-low temperature in a liquid gas.