آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۶، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۷

پاسخ بویایی زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* به مواد فرار حشره میزبان و میوه انار در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه شفقی[۱]، سید حسین گلدان‌ساز[۱]✉ و آرمان آوند فقیه[۲]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران؛
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

رفتارهای جستجوگری دشمنان طبیعی مانند شناسایی و پذیرش میزبان به مواد فرار شیمیایی ترشح و متصاعد شده از مجموعه گیاه- میزبان ارتباط دارد. شناسایی چنین ترکیباتی در درک و تفسیر پاسخ‌های رفتاری پارازیتوئیدها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. در مطالعه حاضر، پاسخ‌های بویایی ماده‌های پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* به بوهای مرتبط با میزبان شامل کرم گلوگاه انار، میوه انار و مواد فرار استخراج شده از آن‌ها با روش هوادهی در بویایی‌سنج دوطرفه Y شکل مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل لارو سن آخر کرم گلوگاه، فضولات لاروی، انار آلوده به کرم گلوگاه و انار با صدمه مکانیکی، بودند. نتایج نشان داد که لارو سن آخر و فضولات لاروی از بیشترین جلب کنندگی برای پارازیتوئید برخوردار بودند. از نظر مدت زمان سپری شده تا انتخاب یکی از تیمارها توسط زنبور، بین انار ترکیده (مکانیکی) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین در بررسی رایحه‌ی ناشی از ترکیبات استخراج شده از تیمارهای مختلف توسط حلال هگزان، تیمارهای همراه با لارو سن آخر کرم گلوگاه انار، فضولات لارو و انار آلوده اختلاف معنی داری را در جلب زنبور در مقایسه با شاهد (هوای پاک) نشان دادند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر و اطلاعات تکمیلی در زمینه شناسایی ترکیب (ترکیبات) موثر در جلب زنبور پارازیتوئید امکان افزایش کارایی زنبور در شرایط طبیعی فراهم می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انار، بویایی‌سنج، پیام رسان‌های شیمیایی، کرم گلوگاه، *Habrobracon hebetor*.

Olfactory responses of parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* to volatile compounds of host insect and pomegranate fruit under laboratory conditions

F. SHAFAGHI[1], S. H. GOLDANSAZ[1]✉ and A. AVAND FAGHIH[2]

1. PhD. Student & Associate Professor, Respectively; Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran; 2-Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Foraging natural enemies rely on semiochemicals from a plant-host complex for recognition and acceptance of host, thus, key compounds that mediate behavioral response of parasitoids must be identified. We studied the choice time and olfactory responses of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) females to the host odors, the Carob moth *Ectomyelois ceratoniae*, pomegranate fruit and extracted hexane associated with them performed by passing a stream of air in a Y-shaped olfactomete. The treatments were last instar larvae of carob moth, its faeces, infested pomegranate and pomegranate with mechanical damages. The results showed that *H.hebetor* preferred carob moth larvae and its faeces. There was significant difference of parasitoids choice time between pomegranate with mechanical damages and other treatment. The results of extracted hexane odor indicated that, the odors spread from the larvae, its faeces and infectrd pomegranate exhibited significant differences in wasp attraction, comparewith the clean air. Based on the results and complementary information on detection of the effective attractants of the parasitoid wasps, the efficacy of the wasp can be increased in the field.

Key words: Carob moth, *Habrobracon hebetor*, olfactometer, pomegranate, semiochemical.

✉ **Corresponding author: goldansaz@ut.ac.ir**

مقدمه

کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)، یک آفت مهم میوه و خشکبار با دامنه میزبانی وسیع، در سراسر دنیا می‌باشد (Al-Izzi *et al*., 1985). این حشره، به خرما، پسته، انار، بادام، انجیر، مرکبات و سیب در دنیا خسارت وارد می‌کند (Warner *et al*., 1990; Shakeri, 1993; Vetter *et al*., 1997; Mehrnejad, 2002) و به عنوان مهم‌ترین آفت انار در ایران شناخته شده است (Shakeri, 1993). دشمنان طبیعی نسبتاً فعالی در باغ‌های انار ایران وجود دارند (Kishani-Farahani *et al*., 2010; Poorjavad *et al*., 2012; Saadat *et al*., 2014; Nobakht *et al*., 2015). زنبور *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) یک اکتوپارازیتوئید لاروی همه جازی است که به عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک این آفت، در باغ‌های انار ایران حضور دارد (KiShani-Farahani *et al*., 2010; Nobakht *et al*., 2015).

پارازیتوئیدها و شکارگرهای گیاه‌خوار برای فعالیت در یک محیط چندمنظوره تکامل یافته‌اند، در نتیجه فیزیولوژی و رفتارشان تحت تاثیر چند سطح تغذیه‌ای قرار دارد که شامل گیاهخواران (سطح دوم تغذیه) و گیاهان مورد تغذیه گیاهخواران (سطح اول تغذیه) می‌باشد، از این رو، دشمنان طبیعی جستجو برای یافتن میزبان را بر اساس اطلاعاتی که از این منابع به دست می‌آورند، پایه‌گذاری می‌نمایند (Vet and Dicke, 1992). بنابراین، اثر بخش بودن استفاده از زنبور پارازیتوئید در برنامه کنترل بیولوژیک تا اندازه زیادی به روابط متقابل بین محیط، گیاه و حشره آفت بستگی دارد. این روابط به واسطه مواد شیمیایی ایجاد می‌شوند (Colazza *et al*., 1997). طی جستجو برای یافتن میزبان، پارازیتوئیدها عموماً از مواد شیمیایی مترشحه توسط گیاه میزبان، میزبان و مواد همراه با میزبان، تأثیر می‌پذیرند (Madden, 1968; Godfray, 1994; Colazza *et al*., 2004). از جمله این مواد شیمیایی، ترکیبات آلی فراری هستند که از گیاهان آسیب‌دیده توسط گیاه‌خواران متصاعد می‌شوند(سینومون‌ها) و می‌توانند پارازیتوئیدها را به سمت میزبان‌شان هدایت کنند (Tumlinson *et al*., 1992; Fadamiro, 2014; Godfray, 1994; Ode, 2006; Morawo and Hilker and Fatouros, 2015). از طرف دیگر، تعداد زیادی از پارازیتوئیدها، میزبان‌های متناسب با خود را از طریق جهت‌یابی به سمت طیفی از سیگنال‌های شیمیایی که اساساً در ارتباط با میزبان هستند (کایرومون‌ها) پیدا می‌کنند. در برخی موارد، این پیام‌رسان‌ها به طور مستقیم با مرحله زندگی میزبان مرتبط نیستند، اما به محدود نمودن حوزه مورد جستجوی پارازیتوئیدها کمک می‌کنند (Godfray, 1994). از جمله این منابع می‌توان فضولات میزبان را نام برد. در توانایی حشرات پارازیتوئید برای استفاده از فضولات میزبان، به عنوان یک جلب‌کننده و یا متوقف‌کننده، تفاوت‌هایی دیده می‌شود (Mandour, 2014). با این حال، گزارش‌های متعددی وجود دارند، مبنی بر این‌که فضولات آفات یک عامل قوی در جلب دشمنان طبیعی می‌باشند (Tang, 2016: Mandour, 2014; Tang *et al*., 2009). شناسایی پیام‌رسان‌های شیمیایی مانند کایرومون‌ها، سینومون‌ها و غیره، نخستین و اصلی‌ترین مرحله تحقیقات در زمینه اکولوژی شیمیایی حشرات می‌باشد. تحقیق حاضر به بررسی مواد فراری می پردازد که سبب جلب زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* به سمت کرم گلوگاه انار می‌شود تا بر مبنای اطلاعاتی که حاصل می‌شود بتوان موفقیت‌های بیشتری را در کنترل این آفت در باغ‌های انار کشور به‌دست آورد.

روش بررسی

جمع‌آوری و پرورش حشرات: انارهای آلوده به کرم گلوگاه انار (رقم ملس ساوه) از باغ‌های انار ساوه جمع‌آوری و به آزمایشگاه بخش حشره‌شناسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران) منتقل شد. در آزمایشگاه انارها بررسی و لاروها، جدا شده و به داخل ظروف پلاستیکی شفاف به ابعاد ۱۳×۱۹×۶ Cm که درب آن‌ها جهت تهویه هوا به ابعاد ۱×۲ Cmسوراخ و با پارچه توری پوشانده شده‌بود، منتقل شد. تغذیه و پرورش لاروها، با پسته رقم فندقی و در

اتاقی با شرایط ثابت (دمای ۱± ۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) انجام شد.

به منظور پرورش زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* در شرایط آزمایشگاهی، از لاروهای سن آخر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) به عنوان میزبان جایگزین استفاده شد. کلنی اولیه‌ی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران (پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج) به دست آمد و در شرایط ثابت (دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شد. غذای مورد استفاده برای پرورش این شب‌پره شامل یک کیلوگرم آرد کامل گندم و سه گرم مخمر آبجو (ناب مایه، ساخت ایران) بود (Attaran, 1996). برای جمع‌آوری زنبور، انارهای پای درختان از باغ‌های جلال‌آباد واقع در نجف‌آباد اصفهان (32.611558 N, 51.313986E) جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. لاروهای فلج شده کرم گلوگاه انار که حاوی تخم پارازیتوئید مورد نظر بودند، درون ظروف پلاستیکی شفاف استوانه‌ای به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر قرار گرفتند و روی ظروف تا زمان ظهور حشرات کامل پارازیتوئید با پارچه توری پوشانده شد. زنبورها جهت شناسایی به بخش رده‌بندی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور فرستاده شد. جهت پرورش زنبورها، ده عدد لارو سن آخر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به همراه یک جفت زنبور نر و ماده یک روزه، به داخل ظروف شفاف به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر منتقل و دهانه ظروف با پارچه‌ی توری مسدود شد. جهت افزایش جمعیت پارازیتوئید، لاروهای شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد یک روز در میان تعویض می‌شدند. تغذیه حشرات کامل زنبور، به وسیله پنبه آغشته به آب و عسل ۲۰ درصد انجام شد.

استخراج ترکیبات فرار: عملیات استخراج ترکیبات فرار تولیدی توسط لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار، فضولات لاروی، انارهای آلوده به لارو و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی، با استفاده از روش هوادهی (Rochat *et al*., 2004) به مدت سه روز انجام شد. دستگاه استخراج به ترتیب شامل پمپ تولید هوا، ذغال فعال، ظرف شیشه‌ای حاوی آب اسمزه، ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها، لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده بوهای شیمیایی و دبی‌سنج فشار هوا بود که توسط شیلنگ‌های تفلون به یکدیگر متصل شده بودند. جریان هوا پس از عبور از روی ذغال فعال برای فیلتراسیون و نیز عبور از روی آب به منظور مرطوب سازی از طریق شیلنگ‌های پلاستیکی تفلونی وارد ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها می‌شد. جریان هوای مرطوب سبب می‌شد بوهای متصاعد شده از لاروها، فضولات و میوه‌های انار وارد لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده، شوند. جهت استخراج، تیمارهای مذکور به تفکیک درون ظروف شیشه‌ای مخصوص که به شکل استوانه و دارای دو انتهای باریک برای اتصال شلنگ و لوله‌های شیشه‌ای باریک بودند، قرار گرفتند. سپس پلیمر جذب کننده بوهای شیمیایی (ماده ساپلپاک تی ام-۲ ساخت شرکت ساپلکو آمریکا) داخل لوله‌های شیشه‌ای باریک (مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم در هر لوله) ریخته شد. در دو انتهای لوله‌های شیشه‌ای مقداری پشم شیشه سترون قرار داده شد به طوری که جریان هوا قادر به عبور از آن باشد. لوله‌های شیشه‌ای از یک طرف به ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها و از طرف دیگر به شیلنگ‌های خروجی دستگاه اندازه‌گیری جریان هوا متصل و در اتاق پرورش حشرات در دمای۱± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. فشار جریان هوا روی ۱۵۰ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. پس از گذشت سه روز، لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده باز شدند و به هر کدام از آن‌ها یک میلی‌لیتر حلال هگزان با درجه خلوص ۹۸ درصد (ساخت شرکت مرک آلمان) اضافه شد. حلال با عبور از پلیمر جذب کننده، سبب شسته شدن مواد جذب شده می‌گردید. محلول‌های به دست آمده در

شیشه‌های دیگر جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شرایط آزمایش ومشخصات بویایی‌سنج: برای انجام این آزمایش‌ها از یک بویایی‌سنج Y شکل استفاده شد که جنس آن از شیشه پیرکس به قطر داخلی ۲۸ میلی‌متر بود. بازوی اصلی ۱۶ سانتی‌متر و هریک از بازوهای فرعی ۲۱ سانتی‌متر طول داشتند. بازوهای فرعی به منبع رایحه متصل شدند. جریان هوا معادل ۱۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه توسط پمپ باد، ایجاد شد (Dweck *et al*., 2010) و پس از تصفیه توسط ذغال فعال، توسط آب اسمزه مرطوب گردید و در هر دو بازوی بویایی‌سنج جریان یافت. پس از هر پنج تست، بازوهای بویایی‌سنج جابه‌جا می‌شد تا عدم تقارن سبب خطای احتمالی نشود. پس از ۱۵ آزمایش، محفظه‌های نگهداری رایحه‌ها جابه‌جا می‌شدند. تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر انجام شدند. ساعت انجام هر تکرار، به صورت چرخشی بین تیمارها تغییر می‌کرد. زنبورهایی که پس از ورود به بویایی‌سنج، حداقل پنج دقیقه در بازوی اصلی می‌ماندند و هیچکدام از بازوهای فرعی را انتخاب نمی‌کردند، از آزمایش حذف می‌شدند.دمای اتاق بویایی‌سنجی ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی بین ۵۰ تا ۷۰ درصد تنظیم شد.

شکل ۱- بویایی‌سنج Y شکل مورد استفاده در آزمایش‌ها
Fig. 1. Y-tube olfactometer used in the experiments

۱- واکنش رفتاری زنبور پارازیتوئید به لاروهای میزبان، فضولات لاروی و میوه‌های انار: هر آزمایش با ۴۵ زنبور ماده‌ی جفت‌گیری کرده انجام شد که حداکثر ۷۲ ساعت از ظهورشان گذشته بود. این زنبورها با آب عسل تغذیه شده بودند، ولی لارو آفت جهت تخم‌ریزی در اختیارشان قرار داده نشده بود. تیمارهای مورد بررسی عبارت بودند از:

الف- لارو سن آخر کرم گلوگاه در یک بازو قرار گرفت و به تناوب با فضولات لاروی، انار آلوده به لارو، و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی به عنوان سه تیمار در بازوی دیگر بویایی‌سنج مقایسه شد.

ب- فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه در یک بازو قرار گرفت و به تناوب با انار آلوده به لارو و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی به عنوان دو تیمار در بازوی دیگر بویایی‌سنج مقایسه شد.

ج- انار آلوده به لارو با انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی مقایسه شد.

۲- زمان دسترسی به بوی جلب‌کننده ها: زمان لازم جهت انتخاب هر یک از بازوهای بویایی‌سنج همانند آزمایش قبلی، توسط زنبور با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. زمان، توسط کرنومتر دستی ثبت شد. زمان از لحظه‌ای که زنبور وارد بویایی‌سنج می‌شد تا زمانی که وارد یکی از بازوها می‌گردید و حداقل ۱۱ سانتی‌متر به جلو می‌رفت، محاسبه شد. برای اطمینان از عدم انتخاب تصادفی، نصف به علاوه ۱ سانتی‌متر از طول بازوی فرعی به عنوان معیار انتخاب گردید. هر آزمایش شامل ۴۵ تکرار بود.

۳- بررسی تاثیر مواد فرار استخراج شده روی واکنش‌های رفتاری زنبور *H. hebetor*: این بخش از آزمایش‌های بویایی‌سنجی با یک میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج هریک از تیمارها، به ازای هر تکرار روی کاغذ صافی به ابعاد Cm ۱×۱ در مقایسه با هوای پاک، با ۳۰ زنبور ماده جفت‌گیری کرده در بویایی‌سنج انجام شد.

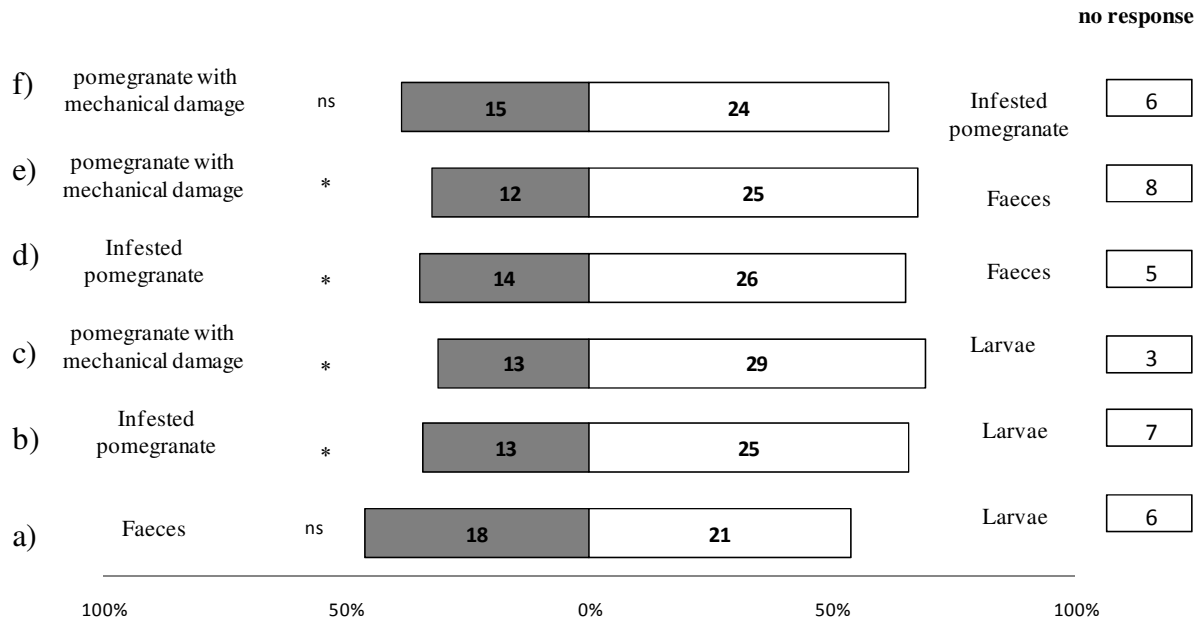
تجزیه‌های آماری: داده‌های مربوط به بویایی‌سنجی به کمک آزمون χ^2 و داده‌های مربوط به زمان جستجوگری با تبدیل لگاریتمی و با استفاده از رویه ANOVA یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Tukey-HSD انجام شد. نرم‌افزار SAS Ver. 9.1 برای تجزیه و

تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد (SAS Institute, 2001). نمودارها با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 رسم شدند.

نتیجه و بحث

۱- پاسخ بویایی زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* به لاروهای میزبان، فضولات لاروی و میوه انار: مقایسه واکنش زنبور پارازیتوئید به لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و فضولات این آفت نشان داد که ٥٤ درصد از زنبورهای ماده (۲۱ عدد) بازوی منتهی به لاروهای سن آخر و ٤٦ درصد از آن‌ها (۱۸ عدد) بازوی منتهی به فضولات را انتخاب نمودند که از نظر قدرت جلب‌کنندگی، بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (Z=0.4804, P= 0.639) (شکل ۲a). مقایسه بین لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار با انارهای آلوده به این لارو، و همچنین لاروهای سن آخر با انار دچار آسیب مکانیکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین آنها بود به طوری که به ترتیب ٦٦ و ٦٩ درصد (۲۵ و ۲۹ عدد) از زنبورها به سمت بازویی که لارو در آن قرار داشت، جلب شدند (به ترتیب Z=2.137, P= 0.032 و Z=2.46, P= 0.0136) (شکل‌های ۲b و ۲c).

مقایسه زوج فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه و انار آلوده به لارو نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار بود به طوری که ٦٥٪ زنبورها (۲٦ عدد) فضولات را انتخاب نمودند (Z=2.0817, P= 0.0374) (شکل ۲d) مقایسه پاسخ بویایی به فضولات و انار دچار آسیب مکانیکی نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار بود به طوری که (Z=2.137, P= 0.032) ٦٨٪ زنبورها به فضولات پاسخ دادند(شکل ۲e). مقایسه بین دو تیمار انار آلوده به لارو با انار دارای آسیب مکانیکی نشان دهنده تفاوت معنی دار بین دو تیمار نبود هرچند که ٦٢٪ یعنی ٢٤ عدد زنبورها، بازوی منتهی به انار آلوده را برگزیدند(Z=1.622, P= 0.1048) (شکل ۲f).



شکل ۲- درصد پاسخ‌های زنبورهای پارازیتوئید ماده *Habrobracon hebetor* به هریک از بازوهای بویایی‌سنج حاوی تیمارهای مختلف (اعداد نوشته شده روی هر بازو، تعداد افراد جلب شده به آن تیمار را نشان می‌دهد)

Fig. 2. The percentage responses of female parasitoid wasps *Habrobracon hebetor* to either olfactometer arm contain different treatments (Numbers in bars are the total numbers of parasitoids responding to each odor source)

یافته‌های این تحقیق نقش بالقوه ترکیبات شیمیایی فرار را در جلب دشمنان طبیعی نشان دادند. زنبورهای پارازیتوئید در مسیر میزبان‌یابی در طبیعت، هم به ترکیبات فرار میزبان‌های گیاهی حشره آفت و هم به ترکیبات فرار حشره‌ی آفت جلب می‌شوند. معمولا، ترکیبات شیمیایی متصاعد شده از میزبان یا بقایای آن (کایرومون‌ها) برای پارازیتوئیدها نسبت به ترکیبات فرار ناشی از گیاه، مانند ترکیباتی که از گیاهان خسارت دیده از آفت، متصاعد شده باشند (سینومون‌ها)، جلب کننده‌تر هستند (Godfray, 1994). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که در شرایط انجام آزمایش، بوهای ناشی از لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و همچنین فضولات آن‌ها در مقایسه با بوهای ناشی از انار آلوده به آفت و یا انار دچار صدمه مکانیکی، می‌توانند عوامل موثرتری در جلب زنبور *H. hebetor* به سمت حشره میزبان باشند.حتی به نظر می‌آید در تیمار انار آلوده به لارو، خود انار تاحدی حالت پوشانندگی روی لارو و فضولات ایجاد کرده و باعث کمتر جلب شدن پارازیتوئید گردیده است. بنا به گزارش Manrique *et al*., (2005) زنبور پارازیتوئید *Anaphes iole* (Hym.: Mymaridae) در بویایی‌سنج، به بوهای گیاهانی که توسط حشره میزبان این زنبور مورد تغذیه و یا تخم ریزی قرار گرفته بودند جلب شد اما به بوهای ناشی از گیاه آسیب دیده به صورت مکانیکی پاسخی نشان نداد. همچنین، پارازیتوئید *Goniozus legneri* (Hym.: Bethylidae) از سیگنال‌هایی مانند حضور خود میزبان یا فضولات آن که از یک فاصله مناسب قابل تشخیص هستند، به عنوان نشانه‌ای خوب جهت یافتن میزبان استفاده می‌کند و به ویژه، فضولات لاروی برای این پارازیتوئید از جذابیت بالایی برخوردار هستند (Aleosfoor *et al*., 2014).

۲- زمان دسترسی به بوی جلب کننده‌ها: یافته‌های حاصل از این آزمایش‌ها نشان داد زمان انتخاب بین دو تیمار لارو و فضولات و همچنین تیمار لارو و انار آلوده اختلاف معنی داری نداشتند به ترتیب (F_{36} =0.58, P = 0.4511; F_{38} =0.93, P = 0.342) در حالی که زمان انتخاب بین دو تیمار لارو و انار با آسیب مکانیکی دارای اختلاف معنی‌دار بودند و زنبورها در زمان کوتاه تری بازوی منتهی به لارو را انتخاب نمودند (F_{40}=5.29, P = 0.026) (جدول ۱).

مقایسه زمان انتخاب بین دو بازوی بویایی‌سنج حاوی دو تیمار فضولات لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و انارهای آلوده به لاروها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بود (F_{38} =0.03, P = 0.873)، در حالی که بین دو تیمار فضولات لاروها و انارهای دچار صدمه مکانیکی، زمان انتخاب زنبورها برای رسیدن به بازوی فضولات به صورت معنی‌داری از زمان انتخاب بازوی مقابل کوتاه‌تر بود (F_{35} =4.58, P = 0.039) (جدول ۱). در بین دو تیمار انارهای آلوده به لارو و انارهای دارای صدمه مکانیکی، پارازیتوئیدها با اختلاف معنی‌دار در زمان کوتاه‌تری انارهای آلوده را انتخاب نمودند (F_{38} =9.57, P = 0.038) (جدول ۱).

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در مدت زمان انتخاب بازوهایی از بویایی‌سنج که حاوی بوی جلب‌کننده برای زنبور بود، بین انارهای دچار آسیب مکانیکی و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت، اما بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این رفتار زنبور، شاید بدین دلیل باشد که سایر تیمارها به نوعی با لاروهای کرم گلوگاه انار در ارتباط بوده‌اند و رایحه‌های ناشی از وجود لاروها، چه به صورت مستقیم (لاروهای سن آخر و انارهای آلوده به لارو) و چه به صورت غیرمستقیم (فضولات لاروهای سن آخر) سبب تسریع در جلب شدن و انتخاب بازوی مورد نظر زنبور شده است.

نتایج به دست آمده تا حدی مشابه تحقیقات انجام شده توسط Mandour (2014) و Mbata *et al*. (2017) می‌باشند. ماندور ثابت کرد که پارازیتوئید *Cotesia kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) از نظر زمانی، در انتخاب بین دو تیمار گیاه سالم و گیاه سالم به همراه فضولات میزبانش *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)، و دو تیمار گیاه آلوده به لارو بدون حضور فضولات، در مقایسه با

جدول ۱- میانگین (±خطای معیار) مدت زمان (ثانیه) انتخاب زنبورهای ماده *Habrobracon hebetor* به سمت تیمارهای مورد بررسی در بویایی‌سنج

Table 1. Mean (±SE) of choice time(s) of *Habrobracon hebetor* females to tested treatments on olfactometer.

Expriment no.	Treatments	Choice time (S)
1	Larvae	110.04±19.04a
	Faeces	124.32±16.9a
2	Larvae	116.20±15.28a
	Infested pomegranate	143.07±23.54a
3	Larvae	60.20±5.45 a
	pomegranate with mechanical damages	111.23±19.45 b
4	Faeces	97.69±17.30a
	Infested pomegranate	96. 9±11.7a
5	Faeces	86.88±13.86 a
	pomegranate with mechanical damages	137.75±19.04 b
6	Infested pomegranate	66.35±17.9 a
	pomegranate with mechanical damages	119.29±12.82 b

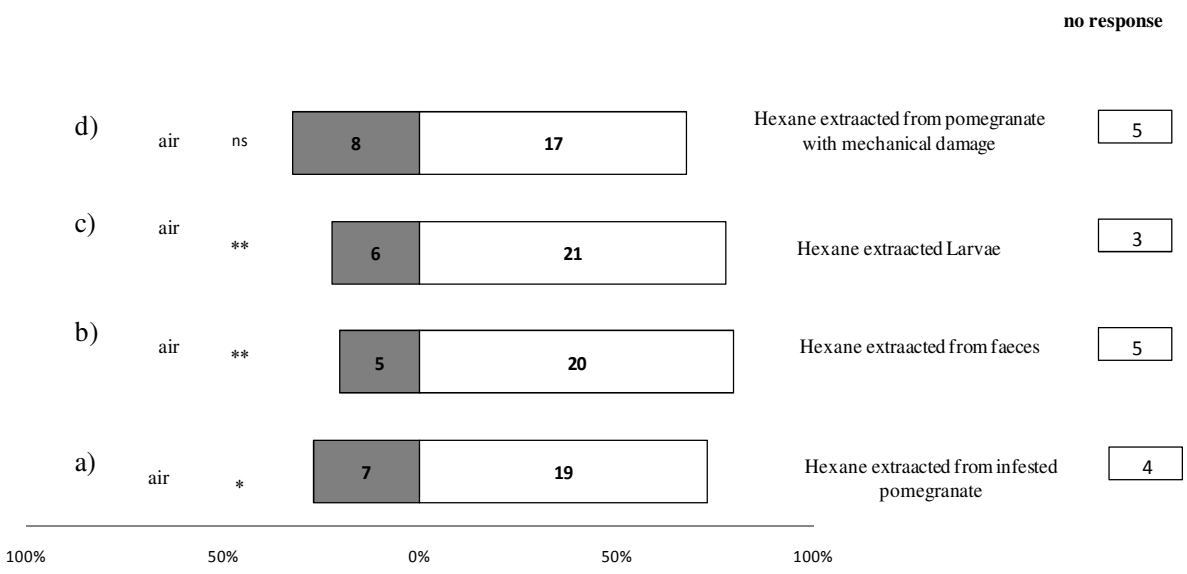
*میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر خانه فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند (آزمون توکی، P<0.05)

∗ Means in a cell followed by the same letters are not significantly different (P< 0.05; Tukey-HSD)

گیاه آلوده به همراه فضولات میزبان، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما این زمان، در تیمارهای در برگیرنده فضولات، تا حدی از سایر تیمارها کوتاه‌تر است (Mandour, 2014).

همچنین مشخص شده زمان پاسخ برای پارازیتوئیدهای *H. hebetor*، که تجربه‌ی تماس قبلی با میزبان را نداشته‌اند وقتی کوتاه‌تر می‌شود که حشرات ماده شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* در بویایی‌سنج قرار بگیرند، در حالی که کوتاه‌ترین زمان انتخاب برای ماده‌های با تجربه قبلی تماس با میزبان، وقتی است که لاروهای زنده و یا فرومون جنسی منبع محرک باشند (Mbata *et al*., 2017). نشانه‌های مربوط به مکان میزبان که مستقیماً از بدن حشرات میزبان پارازیتوئید منشا می‌گیرند، احتمالاً در طبیعت کمیاب‌تر هستند و این موضوع می‌تواند دلیل انتخاب طبیعی قوی‌تر میزبان‌هایی باشدکه چنین نشانه‌هایی را تولید می‌کنند (Mandour, 2014).

۳- پاسخ بویایی زنبور *H. hebetor* به مواد فرار استخراج شده از لارو کرم گلوگاه انار و میوه انار: با بررسی مواد فرار استخراج شده از تیمارهای مورد آزمایش روی پاسخ‌های بویایی زنبور پارازیوئید مشخص گردید که ۷۳ درصد زنبورهای ماده یعنی ۱۹ عدد، رایحه ناشی از مواد فرار استخراج شده از انارهای آلوده را بر هوای پاک ترجیح دادند (شکل ۳a). مقایسه بین رایحه هگزانی استخراج شده از فضولات و همچنین لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار در مقایسه با هوای پاک نشان داد که به ترتیب ۸۰ و ۷۹ درصد معادل ۲۰ و ۲۱ عدد از زنبورها تیمارهای مورد بررسی را ترجیح دادند (شکل‌های ۳b و ۳c). در نهایت، ٦٨ درصد یعنی ۱۷ عدد از زنبورها به سمت رایحه استخراج شده از انار ترکیده (به صورت مکانیکی) جلب شدند (شکل ۳d). در مقایسه با هوای پاک، رایحه‌های استخراجی از لاروهای سن آخر کرم گلوگاه (Z=-2.85, P=0.0043)، فضولات آن (Z= -2.04, P= 0.00412) و انارهای آلوده (Z= -2.29, P= 0.0218) اختلاف معنی‌داری را در جلب کردن زنبور نشان دادند در حالی که بین رایحه‌های استخراجی از انارهای آسیب‌دیده به روش مکانیکی (Z= -1.70, P= 0.881) در مقایسه با هوای پاک اختلافی مشاهده نشد. نتایج به دست آمده نشان دادند که به غیر از تیمار عصاره انارهای ترکیده به صورت مکانیکی، سایر تیمارها برای زنبور جلب کننده بودند.



شکل ۳–درصد پاسخ‌های زنبورهای پارازیتوئید ماده *Habrobracon hebetor* به هریک از بازوهای بویایی‌سنج دربرگیرنده مواد فرار استخراج شده از لارو کرم گلوگاه انار و میوه انار در در مقایسه با هوا (اعداد نوشته شده روی هر بازو، تعداد افراد جلب شده به آن تیمار را نشان می‌دهد)

Fig. 3. The percentage responses of female parasitoid wasps *Habrobracon hebetor* to either olfactometer arm contain extracted volatile of *Ectomyelois ceratoniae* larve and pomegranate fruit vs. air (Numbers in bars are the total numbers of parasitoids responding to each odor source)

Fazeli-Dinan *et al.* (2015) در تحقیقات خود نشان دادند که زنبور *Encarsia formosa* (Hym.: Aphelinidae) به گیاهان خیار سالم بدون حضور میزبان نیز جلب گردید. وی بیان نمودکه که زنبور رایحه ناشی از گیاه را تشخیص داده و در نتیجه، از نظر تکاملی با دریافت این رایحه‌ها احتمال حضور سفیدبالک را روی گیاه متصور می‌شود. این نتیجه با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مغایرت دارد. این تفاوت ممکن است به این دلیل باشد که اولا دو زنبور دو گونه متفاوت و با شرایط اکولوژیک متفاوت هستند و در ضمن، احتمال دارد که وجود هگزان در تیمار مورد بررسی در این تحقیق بر واکنش زنبور نسبت به بوی گیاه تاثیرگذار بوده است. با وجود این بررسی Silva *et al.* (2006) نشان داد که مواد هگزانی استخراج شده از نرهای میزبان *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) توانست ماده‌های زنبور پارازیتوئید تخم *Telenomus podisi* Ashmead (Hym.: Scelionidae) را در داخل بویایی‌سنج جلب کند. همچنین، زمانی که رایحه هگزانی با تخم میزبان همراه شد، تمایل پارازیتوئید به انتخاب افزایش یافت.

در بررسی حاضر زمانی که ازمیوه‌ی انار چه به صورت آسیب مکانیکی و چه انار آلوده استفاده کردیم به لحاظ حجم بوهای دریافتی بالاتر، هر دو تیمار برای پارازیتوئید جلب کننده بودند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها به دست نیامد، هرچند که تعداد زنبورهای جلب شده به سمت انار آلوده بیشتر بود. اما زمانی که از رایحه‌ی استخراجی استفاده شد این مواد فرار رقیق شده و حجم مواد دریافتی پایین آمد و شاید این حجم برای جلب زنبور در تیمار انار با آسیب مکانیکی کافی نبود اما از آن‌جایی که انار آلوده برای پارازیتوئید جذاب‌تر بود در این‌جا نیز تا حدی قادر به جلب زنبور گردید هرچندکه این تیمار نیز نسبت به تیمار لارو و فضولات قدرت جلب‌پایین‌تری نشان داد با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد از دیدگاه کاربردی در جلب پارازیتوئیدها، کایرومون‌ها نسبت به سینومون‌ها قابل اطمینان‌تر می‌باشند.

شناخت بهتر از سازو کارهایی که سبب به حداکثر رساندن قدرت کاوشگری شکارگرها و پارازیتوئیدها می‌شوند،

می‌تواند در موفق‌تر اجـرا نمـودن برنامـه‌ی کنتـرل بیولوژیـک آفات موثر باشد (Kishani-Farahani *et al.*, 2017). استفاده موثر از کایرومونها می‌تواند کارآیی پارازیتوئیدها را در برنامـه هـای کنتـرل بیولـوژیکی افـزایش دهـد (Vet *et al*., 1995; Phillips, 1997; Scholler and Prozell, 2002) ایـن مطالعـه، *H. hebetor* عمدتاً از نشانه‌های بویایی مربوط به لاروهای کرم گلوگاه انار بـرای پیـدا کـردن میزبـان خـود اسـتفاده نمـود. در تمـام آزمایش‌هایی که در آن‌ها عصاره‌های شیمیایی مرتبط با لاروها یا خود لاروها وجود داشتند، پاسخ پارازیتوئید از سایر تیمارها بیشتر بود. این نتایج نشان دادند که کایرومون‌ها سیگنال اصلی مورد استفاده توسط این زنبور برای بروز رفتـار جسـتجوگری آن بـوده‌انـد. بـرای ایـن کـه مشـخص شـود ایـن ترکیبـات جلب‌کننده در شرایط میـدانی چـه انـدازه کـارایی دارنـد، بـه تحقیقات تکمیلی نیاز می‌باشد که پس از مشـاهده پاسـخ‌هـای مثبت قابل توجه، می‌توان با سنتز ماده‌ی اصلی جلب کننـده و اطمینان از عدم مخاطرات زیست محیطـی ایـن ترکیبـات ، از آن‌ها برای بهینه‌سازی کنترل بیولوژیک در باغ‌ها استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای دکتر کـاظم محمـدپور عضـو هیات علمی موسسه تحقیقـات گیـاه‌پزشـکی کشـور و آقایـان مهندس مهران فرقانی‌پور و مهندس خسرو قهرمـانی در مرکـز حفظ نباتات شهرستان ساوه کـه در ایـن تحقیـق مـا را یـاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

References

ALEOSFOOR, M., F. EHTESHAMI and L. FEKRAT, 2014. A six-arm olfactometer for analysing olfactory responses of *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae), the larval ectoparasitoid of carob moth, Journal of Entomological and Acarological Research, No. 46: 119-122.

AL-IZZI, M. A. J., S. K. AL-MALIKY and N .F. JABBO, 1985. Bionomics of *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) on pomegranates in Iraq, Journal of Environmental Entomology, No. 14: 149–153.

ATTARAN, M. R. 1996. Effect of laboratory hosts on biological attributes of parasitoid wasp *Bracon hebetor* Say, M. Sc. Thesis of Tarbiat Modares University, Tehran, 77 pp. (in Persian with English Summary).

COLAZZA, S., M. C. ROSI and A. CELEMENTE, 1997. Response of egg parasitoid *Telenomus busseolae* to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides*, Journal of Chemical Ecology, No. 23(11): 2437-2444.

COLAZZA, S., G. P. MCELFRESH and J. G. MILLAR, 2004. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and ovipositing on *bean* spp. that attracts the egg parasitoid *Trissolucus basalis*, Journal of Chemical Ecology, No.30: 945–964.

DWECK, H. K. M., G. P. SVENSSON, E. A. GUNDUZ and O. ANDERBRANT, 2010. Kairomonal Response of the Parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the Male-Produced Sex Pheromone of Its Host, the Greater Waxmoth, *Galleria mellonella* (L.), Journal of Chemical Ecology, No.36: 171–178.

FAZELI-DINAN, M. R., R. TALAEI-HASSANLOUI, H. ALLAHYARI, A. KHARAZIPAKDEL and H. MOHAMMADI, 2015. Olfactometric responses of *Encarsia formosa* (Hym.: Aphelinidae) to odors of infested greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae), *by Lecanicillium longisporum* treated on cucumber leaves. Plant Pests Research, No. 5(1): 1-12. (in Persian with English Summary).

GODFRAY, H. C. J. 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton, University Press, Princeton, New Jersey, 473pp.

HILKER, M. and N. E. FATOUROS, 2015. Plant responses to insect egg deposition, Annual Review of Entomology, No. 60: 493–515.

KISHANI-FARAHANI, H., S. H. GOLDANSAZ, O.

SABAHI and M. SHAKERI, 2010. Larval parasitoids of the carob moth Ectomyelois ceratoniae in three regions of Iran Varamin Qom and Saveh.Iranian, Journal of plant protection science, No. 41(2): 337-344. (in Persian with English Summary).

KISHANI-FARAHANI, H., Y. MOGHADASI, P. ABRUN, and A. ASHOURI, 2017. Olfactory learning and memory retention in Venturia canescens (Hym.: Ichneumonidae). Journal of Entomological Society of Iran,37(1)15-26. (in Persian with English Summary).

MADDEN, J. L. 1968. Behavioural responses of parasites to the symbiotic fungus associated with Sirex noctilio F, Nature,No. 218: 189–190.

MANDOUR, N. S. 2014. Effect of Host Frass on Searching Behavior and Parasitization of Cotesia kariyai Watanab, Egyptian journal of pest control, No.24 (1): 183-189.

MANRIQUE, V., W. A. JONES, L. H. WILLIAMS and J. S. BERNAL, 2005. Olfactory Responses of Anaphes iole (Hymenoptera: Mymaridae) to Volatile Signals Derived from Host Habitats. Journal of Insect Behavior, No. 18 (1): 89-104

MBATA, G. N., T. SHU, W. PHILLIPS and S. B. RAMASWAMY, 2017. Semiochemical cues used by *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae) to locate its host, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), Annals of the Entomological Society of America, No. 97: 353–360.

MEHRNEJAD, M. 2002. Biology of carob moth, *E. ceratoniae* new pest on pistachio in Rafsanjan, Applied Entomology and Phytopathology, No. 60: 1–11.

MORAWO, T. and H. FADAMIRO, 2014. Duration of Plant Damage by Host Larvae Affects Attraction of Two Parasitoid Species (*Microplitis croceipes* and *Cotesia marginiventris*) to Cotton: Implications for Interspecific, Journal of Chemical Ecology, No. 40 (11): 1176-1185.

NOBAKHT, Z., J.KARIMZADEH and S. SHAHKARAM-JAFARI, 2015. Identification of parasitoids of *Apomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) on pomegranate in Isfahan province, Journal of Entomology and Zoology Studies, No.3 (1): 287-289.

ODE, P. J. 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on herbivore and natural enemy interactions, Annual Review of Entomology, No. 51: 163–185.

PHILLIPS, T. W. 1997. Semiochemicals of stored-product insects: research and application, Journal of Stored Products Research, No, 33:17–30.

POORJAVAD, N., S. H. GOLDANSAZ, T. MACHTELINCKX, L. TIRRY, R. STOUTHAMER, and T. V. LEEUWEN, 2012. Iranian *Trichogramma*: ITS2 DNA characterization and natural *Wolbachia* infection, BioControl, No. 57(3): 361-374.

ROCHAT, D., K. MOHAMMADPOOR, C. MALOSSE, A. AVAND-FAGHIH, M. LETTERE, J. BEAUHAIRE, J. P. MORIN, A. PEZIER, M. RENOU and G. A. BBDOLLAHI, 2004. Male aggregation pheromone of date palm fruit stalk borer *Oryctes elegans*, Journal of Chemical Ecology, No. 30(2): 387-407.

SAADAT, D., A. A. SERAJ, S. H. GOLDANSAZ and J. KARIMZADEH, 2014. Environmental and maternal effects on host selectionand parasitism success of *Bracon hebetor*, BioControl, No. 59: 297–306.

SAS INSTITUTE INC. 2001. SAS/ Stat users Guide, version 9.1 SAS Institute Inc, Cary, NC.

SCHOLLER, M. and S. PROZELL, 2002. Response of *Trichogramma evanescens* to main sex pheromone component of *Ephestia* spp. and *Plodia interpunctella*, (Z,E)-9, 12-tetra-decadenyl acetate (ZETA), The Journal of Stored Products Research, No. 38: 177–184.

SHAKERI, M. 1993. First report of attack of *spectrobates ceratoniae* Zell. To figs in Iran, Applied Entomology and Phytopathology, No. 60: 29-32.

SILVA, C. C., M. C. B. MORAES, R. A. LAUMANN and M. BORGES, 2006. Sensory response of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to stimuli from the bug *Euschistus heros*, Pesquisa Agropecuária Brasileira, No. 41(7): 1093-1098.

TANG, Q. 2016. Olfactory responses of *Theocolax elegans* (Hymenoptera, Pteromalidae) females to volatile signals derived from host habitats, Journal of Hymenoptera Research, No. 49: 95–109.

Parasitoid foraging and learning. In: Carde RT, Bell WJ (eds) Chemical ecology of insects II. Chapman & Hall, New York, pp 65–101.

VETTER, R. V., S. TATEVOSSIAN and T. B. BAKER, 1997. Reproductive behaviour of the female carob moth (Lepidoptera: Pyralidae), Pan-pacific entomologist, No 73(1):28-35.

WARNER, R., L. M. BARNES, E. F. LAIRD and M. D. LANHAM, 1990. Chemical control of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), and various nitidulid beetles (Coleoptera) on 'Deglet Noor' dates in California, Journal of Economy and Entomology, No.83: 2357-2361.

TANG, Q. F., Y. J. WU, B. M. LIU and Z. L. YU, 2009. Olfactory responses of *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) to volatile signals derived from host habitats, Philippine Agricultural Scientist, No. 92(2): 133–142.

TUMLINSON, J. H., T. C. J. TURLINGS and W. J. LEWIS, 1992. The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging, Agricultural Zoology Reviews, No. 5: 221–252.

VET, L. E. M. and M. DICKE, 1992. Ecology of Infochemical Use by Natural Enemies in a Tritrophic Context, Annual Review of Entomology, No. 37: 141-172.

VET, L. E. M., W. J. LEWIS and R. T. CARDE, 1995.