نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۲۹۳-۲۷۷ ,(۳)۴۰ ,۱۳۹۹

JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2020, 40 (3), 277-293

DOI: 10.22117/JESI.2020.341401.1356

# پاسخ‌های بویایی زنبور *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) به ترکیبات شیمیایی فرار کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) و گیاه میزبان آن

فاطمه شفقی[۱و*]، آرمان آوندفقیه[۲] و سید حسین گلدان‌ساز[۱]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران و ۲- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی تهران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: azadehshafaghi@ yahoo.com

**چکیده**

کیمیاپیام‌ها، نقش مهمی در روند انتخاب میزبان توسط انگل‌واره‌ها ایفا می‌کنند. در این پژوهش، پاسخ‌های زنبور انگل‌وارهٔ *Habrobracon hebetor* (Say) به مواد فرار کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* Zeller و میوهٔ انار به عنوان گیاه میزبان آن و مواد فرار القایی در گیاه میزبان توسط حشره گیاه‌خوار در بویایی‌سنج دو طرفه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، لارو سن آخر کرم گلوگاه انار و فضولات آن، میوهٔ انار دچار آسیب مکانیکی و میوهٔ انار شکافته آلوده به لارو آفت، بیشترین جلب‌کنندگی را برای زنبور انگل‌واره داشتند. مواد فرار کرم گلوگاه انار و فضولات لاروی، با روش ریز استخراج بر روی فاز جامد (Solid Phase Micro-Extraction) استخراج شدند. سپس این مواد با بکارگیری گاز کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی شناسایی شدند. ۴۰ ترکیب فرار از لارو سن آخر کرم گلوگاه انار و ۴۵ ترکیب فرار از فضولات لاروی شناسایی شدند. ترکیبات اصلی شناسایی شده پنتادکن، نونانال، اکتانال، دکانال، هگزانال و لیمونن بودند. انجام بررسی‌های بیشتر برای ارزیابی جلب‌کنندگی ترکیبات شناسایی شده از *E. ceratoniae* و همچنین مواد فرار القایی ضروری می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** زیان‌گر پیام (کایرومون) ، هم‌بهر پیام (سینومون) ، انگل‌واره، بویایی سنج، انار، میزبان‌یابی

# Olfactory responses of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) and its host plant

Fatemeh Shafaghi[*,1], Arman Avand-Faghih[2] & Seyed Hossein Goldansaz[1]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran & 2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran. Iran.

* Corresponding author, E-mail: azadehshafaghi@yahoo.com

**Abstract**

Semiochemicals play a key role on host selection of parasitoids. Responses of parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor* (Say), to volatiles emitted from *Ectomyelois ceratoniae* Zeller larva, pomegranate as its host plant and herbivorous induced plant volatiles (HIPVs) were investigated using a Y-shaped olfactometer. The results showed that the last larval instar of *E. ceratoniae*, its feces, the mechanically damaged pomegranates and the infested pomegranates by larva were attractive for the parasitoid wasp. The volatiles of *E. ceratoniae* larvae and its feces were extracted by solid phase micro-extraction and then identified by GC-MS. Respectively, 40 and 45 components were identified in headspaces of the last larval instar of *E. ceratoniae* and its feces. The major identified components were 1-Pentadecane, Nonanal, Octanal, Decanal, Hexanal and Limonene. More studies are needed to identify HIPVs and also to evaluate the behavioral activity of identified volatiles.

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵، پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴.

دبیر تخصصی: احد صحراگرد

**Key words:** Kairomone, Synomone, Parasitoid, Olfactometer, Pomegranate, Host finding
*Received:* 5 January 2020, *Accepted:* 14 November 2020.

## مقدمه

انار با نـام علمـی *Punica granatum* L. درخت یا درختچه‌ای پر شاخ و برگ، با پاجوش‌های زیاد متعلق به کوچک‌ترین خانوادهٔ گیاهی Punicaceae می‌باشد. این درخت، در اقلـیم‌هـای خشک، نیمه‌گرمسیری و مدیترانه‌ای رشد می‌کند و باردهی خوبی دارد. با مناطق دارای تابستان‌های گرم و زمستان های سرد سـازگار است و از مقاومت نسبتاً زیادی نسبت به عوامل بوم شناختی برخوردار می‌باشد (Ozgen *et al*., 2008). در حال حاضر کشور ایران بیشترین میزان سطح زیر کشت انار جهان را به خود اختصاص داده است. به طوریکه بر اساس آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی (۹۶-۹۷) سطح زیرکشت باغ‌های غیربـارور، بـاغ‌هـای بـارور، میـزان تولیـد، عملکـرد آبی و دیم این محصول بـه ترتیـب عبارت از ۱۳۳۰۳ هکتـار، ۷۰۶۳۰ هکتـار، ۱۰۸۶۶۳۰تـن، ۸۴۲۱ کیلـوگرم درهکتار و ۸۴۱ گیلوگرم در هکتار می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2018).

کرم گلوگاه، *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)، مهم‌ترین آفت انار در ایران است که ضمن تغذیه از میوه، باعث کاهش کمی و کیفی و بازارپسندی میوه می‌شود. این حشره، آفتی چندخوار است و علاوه بر انار بر روی گیاهان میزبان دیگر نیز موجب خسارت می‌شود. از مهم‌ترین میزبان‌های آن، علاوه بر انار می‌توان به خرنوب، پسته، مرکبات، خرما، انجیر، انبه، گردو، شاه بلوط و بادام اشاره کرد (Mehrnejad, 2002; Nay, 2006). این آفت در دو مرحله درختی و انباری به طور متوسط تا ٤٥ درصد به محصول انار خسارت می‌زند (Mehrnezhad, 1992). با توجه به نحوهٔ زندگی و تغذیه لارو این آفت در داخل میوه ، تماس مستقیم آن با سموم حشره‌کش و در نتیجه کنترل شیمیایی آن دشوار است (Aleosfoor *et al*., 2014).

زنبور *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) یک انگل‌وارهٔ خارجی، تجمعی و تندزیستا (Idiobiont) است که لاروهای بال‌پولک‌داران از جمله شب‌پره‌های خانواده Pyralidae را هم در مزرعه و هم در انبار موردحمله قرار می‌دهد (Faal- Mohammad-Ali & Shishehbor, 2013). زنبور انگل‌وارهٔ *H. hebetor* به علت برخورداری از نرخ تولیدمثل بالا، دوره نسلی کوتاه و طیف میزبانی وسیع به صورت گسترده در مطالعات مربوط به اثر متقابل بین انگل‌واره و میزبان مورد بررسی قرار گرفته است (Gunduz & Gulel, 2005). یکی از میزبان‌های باغی مهم این انگل‌واره، کرم گلوگاه انار *E. ceratoniae*, می‌باشد (Kishani Farahani *et al*., 2011).

زنبورهای انگل‌واره، میزبان خود را با استفاده از نشانه‌های بویایی، بینایی، محرک‌های تماسی و صدا شناسایی می‌کنند. آن‌ها می‌توانند هریک از این نشانه‌ها را به تنهایی و یا در تعامل با یکدیگر، به منظور افزایش دقت در تعیین موقعیت میزبان، مورد استفاده قرار دهند. نشانه‌های بویایی بهره‌وری برای یافتن میزبان را، از طریق کاهش زمان جستجو و نیز انرژی صرف شده افزایش می‌دهند (Soyelu, 2014). فیزیولوژی و رفتار انگل‌واره‌ها و شکارگرهای حشرات گیاهخوار تحت تأثیر سطوح مختلف زنجیره غذایی شامل گیاهخواران (سطح دوم زنجیره غذایی) و گیاهان مورد تغذیه گیاهخواران (سطح اول زنجیره غذایی) می‌باشد. از این رو دشمنان طبیعی، جستجو برای یافتن میزبان را بر اساس اطلاعات دریافت شده از این منابع پایه‌گذاری می‌نمایند (Vet & Dicke, 1992). از آن‌جایی‌که بندپایان گیاه‌خوار در حجم بسیار کم مبادرت به تولید علائم بویایی می‌کنند، بر این اساس شناسایی این نشانه‌ها از فواصل دور برای دشمنان طبیعی مشکل است. از منظر تکاملی نیز، گیاه‌خواران به دلیل فشار انتخاب طبیعی به سمتی سازگار می‌شوند که با کاهش تولید این مواد، حضور خود را برای دشمنان طبیعی کمتر آشکار

نمایند (Turlings *et al.*,1991; Vet & Dicke, 1992). همچنین نشانه‌های بویایی یک حشره میزبان خاص در طبیعت همواره ثابت نیستند و انگل‌واره‌ها نیاز به انعطاف‌پذیری برای تطابق با این تنوع زیاد دارند ( Hilker & McNeil, 2008). به منظور افزایش استقرار مؤثر عامل کنترل بیولوژیک و در نتیجه مدیریت کنترل آفات، بررسی محرک‌های متعددی که بر رفتار میزبان‌یابی انگل‌واره‌ها تأثیر می‌گذارند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. ترکیبات شیمیایی فرار تولید شده توسط گیاه میزبان، شورانه‌ها (Pheromones) و سایر ترکیبات شیمیایی منتشر شده از مراحل مختلف رشدی حشره گیاه‌خوار، فضولات و پوسته‌های آنها می‌توانند برای جلب انگل‌واره‌ها به سمت حشرات میزبان استفاده شوند (Mbata *et al.*, 2017). به طور کلی می‌توان گفت دانستن اثرات متقابل اجزای زنجیره غذایی برای مطالعه زیست بوم‌ها بسیار مهم می‌باشد (Gladbach *et al.*, 2011).

در پژوهش حاضر واکنش‌های رفتاری زنبور انگل‌وارهٔ *H. hebetor* به لارو حشرهٔ گیاهخوار کرم گلوگاه انار، *E. ceratoniae* و گیاه میزبان آن، میوهٔ انار و همچنین مجموعه حشره گیاه‌خوار و گیاه میزبان آن بررسی شد. این پژوهش با توجه به لزوم توسعه روش‌های کنترل غیر شیمیایی کرم گلوگاه انار، به خصوص مهار زیستی، به مطالعه بوم‌شناسی شیمیایی زنبور *H. hebetor* با تأکید بر دگرکیمیاپیام‌های (Allelochemical) مؤثر در جلب این زنبور به سمت کرم گلوگاه انار و گیاه انار می‌پردازد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و پرورش حشرات

انارهای آلوده به کرم گلوگاه انار (رقم ملس ساوه) از باغ‌های انار ساوه جمع‌آوری و به آزمایشگاه بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) منتقل شدند. در آزمایشگاه، لاروها از میوه‌های آلوده، جدا شده و به داخل ظروف پلاستیکی شفاف به ابعاد ۱۳×۱۹×۶ سانتیمتر که در آن‌ها جهت تهویه هوا به ابعاد ۱×۲ سانتیمتر سوراخ و با پارچه توری پوشانده شده بود، منتقل شدند. لاروها بر روی پسته رقم فندقی در اتاق پرورش حشرات (دمای ۱± ۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) پرورش داده شدند (Aleosfoor *et al.*, 2014).

برای جمع‌آوری زنبور *H. hebetor*، انارهای پای درختان از باغ‌های جلال‌آباد واقع در نجف‌آباد اصفهان، با موقعیت جغرافیایی 32°36'50"N و 51°30'27"E جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. لاروهای فلج شدهٔ کرم گلوگاه انار که حاوی تخم انگل‌واره مورد نظر بودند، درون ظروف پلاستیکی شفاف استوانه‌ای به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتیمتر قرار داده شدند و روی ظروف با پارچه توری پوشانده شد. زنبورهای خارج شده جهت شناسایی به بخش تحقیقات رده‌بندی حشرات مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور ارسال شدند. به منظور پرورش زنبور انگل‌واره *H. hebetor* در شرایط آزمایشگاهی، از لاروهای سن آخر شب‌پرهٔ مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)، به عنوان میزبان آزمایشگاهی استفاده شد. گروهه (Colony) اولیهٔ شب‌پرهٔ مدیترانه‌ای آرد از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج (دانشگاه تهران) تهیه و در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و 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).

به منظور پرورش زنبورها، ۱۰ عدد لارو سن آخر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به همراه یک جفت زنبور انگل‌واره نر و ماده یک روزه، به داخل ظروف شفاف به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر منتقل شدند و دهانه ظروف با پارچه توری مسدود شد. علت انتخاب ۱۰ عدد لارو به این دلیل بود که برای آزمایش‌های روزانه به تعداد نسبتاً بالایی زنبور نیاز بود، بنابراین تعداد بیشتری لارو گذاشته شد تا در بین آنها لارو مناسب برای تخمریزی در دسترس زنبور باشد. لاروهای شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد یک روز در میان تعویض شدند. تغذیه حشرات کامل زنبور، به وسیله پنبه آغشته به آب و عسل ۲۰ درصد انجام شد.

### آزمایش‌های بویایی‌سنجی

شرایط انجام آزمایش دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ تا ۷۰ درصد بود. تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر و در دورهٔ روشنایی انگل‌واره انجام شدند. نور اتاق توسط یک لامپ ۲۰ واتی قرمز تأمین شد برای انجام این آزمایش‌ها از یک بویایی‌سنج دو طرفه 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 ایجاد (Dweck *et al*., 2010) و پس از تصفیه توسط ذغال فعال ضمن عبور از آب اسمزه مرطوب شد و سپس در هر دو بازوی بویایی‌سنج جریان یافت. پس از هر پنج آزمایش، بازوهای بویایی‌سنج ۱۸۰ درجه چرخانده می‌شد تا آثار خطاهای احتمالی ناشی از عدم تقارن محیط در نتایج آزمایش‌ها رفع شود. هر آزمایش با ۴۵ زنبور نر و ۴۵ زنبور ماده انجام شد. زنبورهایی که حداقل پنج دقیقه در بازوی اصلی ماندند و هیچکدام از بازوهای فرعی را انتخاب نکردند، از آزمایش حذف شدند. انتخاب‌های مورد بررسی شامل زیان‌گر پیام‌ها یا رایحه‌های ناشی از لارو سن دوم و لارو سن آخر کرم گلوگاه انار، رایحه ناشی از فضولات لارو آفت (حدود ۰/۵ گرم برای هر آزمایش که از روی لاروهای تغذیه کرده روی پسته جمع‌آوری شد) و هم‌بهر پیام‌ها یا رایحه ناشی از انارهای شکاف داده (آسیب مکانیکی) و غیر شکافته شده بدون آفت، و انارهای شکاف داده و غیر شکافته شده آلوده به آفت بودند. برای هر آزمایش حدود ۵۰ گرم میوه انار (برای بین یک تا سه عدد لارو با توجه به سن لاروی ) استفاده شد.

### تجزیهٔ آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به بویایی سنجی به کمک آزمون Chi- Square ($\chi 2$) که معنی‌داری اختلاف در پاسخ انگل-واره‌ها نسبت به پراکنش ۵۰ درصد را بررسی می‌کرد، تجزیه آماری شدند. افراد بی پاسخ در تجزیه آماری لحاظ نشدند. از نرم افزار SAS® Ver. 9.4 (SAS, 2013) برای تجزیه داده‌ها استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell 2007 ترسیم شدند.

### آزمایش‌های استخراج و تجزیهٔ شیمیایی

این آزمایش به منظور استخراج و شناسایی مواد فرار کرم گلوگاه انار و فضولات آن که در آزمایش‌های بویایی سنجی بیشترین میزان جلب‌کنندگی را داشتند، انجام شد. تیمارها شامل ۶ عدد لارو سن آخر کرم گلوگاه و ۰/۵ گرم فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه بودند.

تیمارها به طور جداگانه درون ظروف شیشه‌ای به قطر ۵ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر با در تفلونی قرار داده شدند. سپس فیبر نازک دستگاه ریز استخراج بر روی فاز جامد (Solid-phase microextraction) که به ضخامت ۶۵ میکرومتر و از جنس پلی دی متیل سیکلوزان–دی وینیل بنزن، ساخت شرکت ساپلکو آمریکا بود، از سوراخی که در درپوش ظرف‌ها ایجاد شد وارد ظروف شیشه‌ای محتوی لارو یا فضولات لاروی شد. فاصله نوک فیبر تا نمونه‌ها حدود یک سانتی‌متر بود. تیمارها به مدت ۲۴ ساعت در معرض فیبر در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه

سلسیوس و رطوبت۱۰±۶۰ درصد و شرایط نوری، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، قرار گرفتند. پس از این مدت استوانک (Piston) را بالا آورده و فیبر جمع شد. سپس فیبر به داخل قسمت انژکتور دستگاه گازکروماتوگراف وارد شد. برای شناسایی ترکیبات فرار منتشر شده از تیمارها از دستگاه گازکروماتوگراف مدل 7890A-Agilent Technologies متصل به طیف سنج جرمی 5975C- VL- MSD با آشکار ساز سه محوری استفاده شد. جداسازی ترکیبات در ستون موئین از نوع Rtx 5 MS با طول ۳۰ متر، قطرداخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۲۵ میکرومتر انجام گرفت. از گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای جداسازی ترکیبات از برنامه دمایی زیر استفاده شد، دمای آون به مدت یک دقیقه در ۴۰ درجه سلسیوس نگه داشته شد و سپس تا ۲۵۰ درجه سلسیوس با سرعت پنج درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش یافت و ۲۰ دقیقه در آن دما نگهداری شد. دمای آشکارساز ۲۳۰ درجه سلسیوس، دمای محل تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس، و سرعت جریان گاز هلیوم در داخل ستون یک میلی لیتر بر دقیقه انتخاب شدند. شناسایی مولکول‌های مورد نظر رایحه‌های القایی توسط کتابخانه NIST و پایگاه داده Wiley انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### پاسخ‌های بویایی زنبور انگل‌واره به زیان‌گر پیام‌های منتشرشده از میزبان

نتایج نشان داد در مقایسهٔ بین پوسته آخرین سن لاروی و هوا، پاسخ ماده‌ها، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو گزینه بود ($\chi 2$ =۱/۷۶ P<۰/۰۵). بین دو انتخاب فضولات لارو سن آخر و هوا، هم انگل‌واره‌های ماده ($\chi 2$ =۳/۳۳ ، P <۰/۰۰۱) و هم انگل‌واره‌های نر ($\chi 2$ =۳/۶۶ ، P <۰/۰۰۱) با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد فضولات را برگزیدند. در انتخاب بین لارو سن آخر کرم گلوگاه انار و هوا افراد ماده در سطح احتمال یک درصد ($\chi 2$ = ۳/۰۴۲ ، P <۰/۰۱) و نرها در در سطح احتمال ۵ درصد ($\chi 2$= ۲/۳۳، P <۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری را بین دو انتخاب نشان دادند. همچنین هنگامی که فضولات، با ماده غذایی مورد تغذیه‌ی لارو (پسته) مقایسه شد، ماده‌ها ($\chi 2$ =۳/۰۰ P < ۰/۰۱) و نرها ($\chi 2$ =۳/۵۴ ، P <۰/۰۱) در در سطح احتمال یک درصد فضولات را انتخاب نمودند. در مقایسه بین دو تیمار لارو سن آخر و لارو سن دوم در هر دو جنس اختلاف معنی‌داری در در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها مشاهده شد (ماده P <۰/۰۵ ، ۲/۳۳= $\chi 2$، نر P <۰/۰۵ ۲/۰۰۰= $\chi 2$) در سایر موارد مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت (جدول شماره ۱ و ۲).

**جدول ۱**- پاسخ‌های بویایی ماده‌های زنبور *H. hebetor* به انتخاب‌های مختلف مرتبط با لارو کرم گلوگاه انار

**Table 1.** Olfactory responses of *H. hebetor* females to different choices associated with carob moth larvae

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Larval Shells vs air | 25 | 14 | 6 | $< 0.05^{*}$ |
| Last instar larval feces vs air | 28 | 8 | 9 | $< 0.001^{**}$ |
| Last instar larvae vs air | 29 | 10 | 6 | $< 0.01^{**}$ |
| Second instar larvae vs air | 22 | 16 | 7 | $0.33^{ns}$ |
| Last instar larval feces vs second instar larval feces | 20 | 18 | 7 | $0.745^{ns}$ |
| Last instar larval feces vs pistachio | 27 | 9 | 9 | $< 0.01^{**}$ |
| Last instar larvae vs second instar larvae | 25 | 12 | 8 | $< 0.05^{*}$ |

** shows treatments have significant differences at 0.01 probability level.
* shows treatments have significant differences at 0.05 probability level.
ns indicate there is no significant differences between treatments.

**جدول ۲**- پاسخ‌های بویایی نرهای زنبور *H. hebetor* به انتخاب‌های مختلف مرتبط با لارو کرم گلوگاه انار

**Table 2.** Olfactory responses of *H. hebetor* males to different choices associated with carob moth larvae

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Larval Shells vs air | 22 | 18 | 5 | 0.26 $^{ns}$ |
| Last instar larval feces vs air | 29 | 7 | 9 | < 0.01$^{**}$ |
| Last instar larvae vs air | 25 | 11 | 9 | < 0.05$^{*}$ |
| Second instar larvae vs air | 21 | 17 | 7 | 0.51 $^{ns}$ |
| Last instar larval feces vs second instar larval feces | 21 | 15 | 9 | 0.32 $^{ns}$ |
| Last instar larval feces vs pistachio | 28 | 7 | 10 | < 0.01$^{**}$ |
| Last instar larvae vs second instar larvae | 24 | 12 | 9 | < 0.05$^{*}$ |

** shows treatments have significant differences at 0.01 probability level.
* shows treatments have significant differences at 0.05 probability level.
ns indicate there is no significant differences between treatments.

یافته‌های گزارش شده در مطالعه ما نشان داد که زنبور انگل‌وارهٔ مورد بررسی، به بوی لارو سن آخر کرم گلوگاه انار و فضولات آن، میزان جلب بالایی را نشان می‌دهد و تا حدودی نیز به بوی پوسته لاروی جلب می‌شود، در حالی‌که بوی لارو سن پایین کرم گلوگاه برای انگل‌واره جذابیتی ندارد. با توجه به اینکه این زنبور، در شرایط طبیعی هم لاروهای سنین بالا را برای انگلی کردن انتخاب می نماید (Shah Alam *et al.*, 2016). نتیجه حاضر تأیید می کند که ترکیبات فرار متصاعد شده از لاروهای سنین مختلف، متفاوت می‌باشد و زنبور با استفاده از حس بویایی، سن مناسب میزبان را تشخیص می‌دهد. همچنین احتمال دارد دز مواد شیمیایی موجود در لارو سن بالا و پایین متفاوت باشد که همین امر سبب جلب شدن زنبور به لارو سن آخر باشد ( Agelopoulos *et al.*, 1995). و لیکن همین انگل‌واره، بین بوی فضولات لارو سن پایین و بوی فضولات لارو سن بالا تفاوتی قائل نشده و به هر دو تیمار جلب می‌گردد. از طرفی برای اطمینان از اینکه بوی پسته موجود در فضولات سبب جلب انگل‌واره شده یا خیر به مقایسهٔ بین این دو تیمار پرداخته شد و نتایج نشان داد که زنبورها تمایلی برای رفتن به سمت بازوی حاوی پسته از خود نشان ندادند. بررسی پاسخ بویایی زنبور انگل‌واره *H. hebetor* به لارو سن پنجم *Helicoverpa armigera* (Hünber) (Lepidoptera: Noctuidae) در مقابل هوا نشان داد که ٦٩/٠٥ درصد از زنبورها به رایحه لارو و ۳۰/۹۵درصد به هوای پاک جلب شدند و در حالی‌که مقایسه پاسخ بویایی این زنبور انگل‌واره به لارو سن سوم شب پره *H. armigera* در مقابل هوا نشان داد که زنبور تفاوت معنی‌داری بین دو گزینه قائل نمی‌باشد (Davoudi Dehkordi *et al.*, 2019). در پژوهش دیگری مشخص شد ابتدا لاروهای سی روزه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* توسط ماده‌های *H. hebetor* ترجیح داده می‌شوند و پس از آن زنبور، آرد حاوی فضولات و حشره کامل را انتخاب می‌کند (Darwish *et al.*, 2003). که این تحقیقات با نتایج پژوهش حاضر مبنی بر جذاب‌تر بودن لارو سن بالا برای این انگل‌واره مطابقت دارد. با توجه به نتایج بررسی حاضر و بررسی‌های Darwish *et al.* (2003) و Davoudi Dehkordi *et al.* (2019) زنبور مورد بررسی به بوی لارو میزبان-هایش مانند کرم گلوگاه انار، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد و کرم میوه گوجه فرنگی و احتمالا سایر میزبان‌ها پاسخ می‌دهد و مشخص است که بوی لاروهای سنین آخر میزبان برای این زنبور جلب کننده می‌باشد. اما اینکه آیا بوی لاروهای سنین بالای غیر میزبان نیز برای این زنبور جذاب می‌باشد یا خیر، نیازمند به انجام بررسی‌های تکمیلی می‌باشد. زنبور *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae) بین سنین اول و پنجم میزبانش *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) توسط نشانه‌هایی مانند فضولات، آسیب‌های ایجاد شده روی گیاه و غیره تفاوت قایل می‌شود. همچنین زمان جستجوی این انگل‌واره روی نشانه‌های زیان‌گر پیام‌های تولید شده توسط سن اول لاروی به صورت معنی‌دار بیشتر از زمان جستجوی نشانه‌های سن پنجم لاروی میزبانش می‌باشدکه نشان‌دهنده توانایی تشخیص سنین مختلف لاروی میزبان توسط انگل‌واره می‌باشد (Mattiacci & Dicke, 1995).

استفاده از فضولات نیز برای تعیین محل نهایی میزبان در انگل‌وارها بسیار رایج است، مطالعات Faraone *et al.* (2017) نشان داد که بوهای فرار منتشر شده از فضولات حشره کامل سرخرطومی به عنوان زیان‌گر پیام سبب جلب زنبور انگل‌وارهٔ لارو *Spintherus dubius* Ashmead (Hymenoptera: Pteromalidae)، به سمت میزبانش می‌شود. بنابراین فضولات به عنوان یک نشانه‌ی غیرمستقیم برای شناسایی و تعیین محل میزبان در مورد این انگل‌واره عمل می‌کنند. نتایج یک بررسی دیگر نشان داد که افراد ماده *Lariophagus distinguendus* Forst. (Hym., Pteromalidae) به بوی فضولات سرخرطومی ذرت جلب می‌شوند (Tang *et al*., 2009). نتایج مشابهی از جلب انگل‌واره *Teocolax elegans* به فضولات میزبانش گزارش شده است (Tang, 2016). در بررسی انجام شده توسط Furstenau *et al.* (2016) مشخص شد که زنبور انگل‌وارهٔ لارو *Holepyris sylvanidis* Brethes (Hym.: Bethylidae) به بوهای ناشی از فضولات میزبانش به شدت جلب می‌شود. طبق نتایج به دست آمده از پژوهش (Davoudi Dehkordi *et al*., 2019) رایحه فضولات میزبان برای زنبور *H .hebetor* جلب کننده است و این زنبور رایحه فضولات را به مواد فرار گیاهان میزبان ترجیح می‌دهد بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که اگر چه مواد فرار منتشر شده از گیاهان می‌توانند به عنوان نشانه‌های مفید و به صورت هم‌بهر پیام برای انگل‌واره در جستجوی میزبان عمل کنند، اما تغذیه توسط حشرات گونه‌های غیر میزبان نیز ممکن است سبب آسیب مشابهی در گیاهان شود که باعث انتشار ترکیبات فرار مشابه گردد. در چنین مواردی، علایم بویایی اطلاعات نادرست در مورد میزبان گیاهخوار، برای انگل‌واره فراهم می‌کند. در نتیجه ممکن است انگل‌واره به نشانه‌های قابل اطمینان‌تری از جمله فرآورده‌های شیمیایی خاصی که به طور مستقیم توسط میزبان تولید می‌شود، نیاز داشته باشد. همین دلیل می‌توان گفت فضولات یک نشانه قابل اطمینان در فرایند جستجوی انگل‌واره‌ها محسوب می‌شوند (De Rejik *et al*., 2016).

## پاسخ‌های بویایی زنبور انگل‌واره به مواد فرار گیاهان میزبان کرم گلوگاه انار

مقایسه پاسخ‌های انگل‌واره به رایحه‌های منتشر شده از گیاه میزبان کرم گلوگاه نشان داد که تنها ماده‌های انگل‌واره با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ($\chi 2 = ۲/۰۰$ P $<$ ۰/۰۵) انار دچار صدمه مکانیکی را به هوا ترجیح دادند و در سایر موارد بررسی شده ماده‌ها و نرها هیچ تفاوتی بین دو انتخاب پیش رو قائل نشدند (جدول‌های شماره ۳ و ٤).

**جدول ۳**- پاسخ‌های بویایی ماده‌های زنبور *H. hebetor* به انتخاب های مختلف مرتبط با گیاه

**Table 3.** Olfactory responses of *H. hebetor* females to different Choices associated with plant

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Pomegranate vs air | 22 | 18 | 5 | 0.53 $^{ns}$ |
| Pomegranate seeds vs air | 23 | 20 | 2 | 0.34 $^{ns}$ |
| Pomegranate with mechanical damage vs air | 26 | 12 | 7 | < 0.05$^{*}$ |
| Pistachio vs air | 19 | 21 | 5 | 0.75 $^{ns}$ |

** shows treatments have significant differences at 0.01 probability level.
* shows treatments have significant differences at 0.05 probability level.
ns indicate there is no significant differences between treatments.

**جدول ٤**- پاسخ‌های بویایی نرهای زنبور *H. hebetor* به انتخاب‌های مختلف مرتبط با گیاه

**Table 4.** Olfactory responses of *H. hebetor* males to different choices associated with plant

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Pomegranate vs air | 21 | 20 | 4 | 0.87 $^{ns}$ |
| Pomegranate seeds vs air | 22 | 17 | 6 | 0.41 $^{ns}$ |
| Pomegranate with mechanical damage vs air | 25 | 14 | 6 | 0.05 $^{ns}$ |
| Pistachio vs air | 17 | 20 | 8 | 0.62 $^{ns}$ |

ns indicate there is no significant differences between treatments.

در این بخش، از آزمایش‌های این پژوهش، سعی شد تا رابطه بین سطح اول تغذیه یعنی میوه انار که میزبان کرم گلوگاه انار می‌باشد و سطح سوم یعنی زنبور انگل‌واره *H. hebetor* به عنوان عامل مهار زیستی این آفت مورد بررسی قرار گیرد. طی بررسی ما در مقایسهٔ بین میوه انار سالم و هوا و همچنین دانه انار و هوا، ماده‌ها و نرهای زنبور هیچ‌گونه تفاوتی بین این میوه انار و هوا قایل نشدند. این‌طور به نظر می‌رسد که به رغم جمع‌آوری جمعیت اولیه انگل‌واره از باغ‌های انار، این گیاه جذابیت خاصی، حداقل در فواصل نزدیک، برای این انگل‌واره ندارد. هرچند که این احتمال وجود دارد که زنبور مورد آزمایش، در فواصل دور از بوی گیاه برای شناسایی میزبان خود استفاده نماید. از آنجایی که زنبور مورد بررسی در این پژوهش، انگل‌واره‌ای است که میزبان‌های گیاهخوار متعددی برای آن شناخته شده که اکثر آن‌ها پلی فاژ بوده و تعداد زیادی از میزبان‌های گیاهی را مورد حمله قرار می دهند، بنابراین به نظر می‌رسد که این تعدد میزبانی، باعث شده است که زنبور به بوی گیاه میزبان چندان واکنش نشان ندهد. در این بررسی میزبان آزمایشگاهی کرم گلوگاه انار یعنی پسته نیز با هوا مورد مقایسه قرار گرفت که بازهم هیچ‌یک از جنس‌های ماده و نر زنبور تفاوت معنی‌داری بین این دو قایل نشدند. به طور مشابه، نتایج پژوهش Farrar *et al.* (2017) نشان داد برگ‌های سالم گیاه کنوکارپوس *Conocarpus* spp. (Combretaceae) که میزبان لاروهـــای شب‌پره برگـــخوار دو نـواری *Streblote siva* (Lefebvre) (Lepidoptera: Lasiocampidae) می‌باشد، قادر به جذب مگس انگل‌واره این شب‌پره *Pales murina Mes*. (Diptera: Tachinidae) نیست. به نظر می‌آید زنبورهای انگل‌واره با دامنه میزبانی محدود از مواد فرار گیاهان میزبان و ترکیبات فرار القایی برای ردیابی میزبان استفاده می‌کنند، در حالی که انگل‌واره‌هایی با دامنه میزبانی وسیع مانند *H. hebetor* ازعلائم شیمیایی مرتبط با حشره میزبان برای پیدا کردن میزبان خود استفاده می‌کنند (Davoudi Dehkordi *et al.*, 2019) بررسی‌هایی در این ارتباط توسط Zhong *et al.* (2011) انجام شده که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مغایرت دارد. نتایج این محققین نشان داده که کنه شکارگر *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) بوهای سه گیاه بادمجان، فلفل و گوجه فرنگی بدون هیچ‌گونه آسیب‌دیدگی را به هوا ترجیح داد. همچنین سه گونه سن شکارگر از خانواده Miridae بین گیاه گوجه‌فرنگی سالم و هوا، گیاه سالم گوجه را انتخاب نمودند ( Silva *et al.*, 2018). احتمال دارد این تفاوت ناشی از اختلاف در خصوصیات شکارگری و انگل‌واره‌ای باشد. ولی در بررسی ما تنها زمانی که انتخاب بین انار دچار آسیب مکانیکی و هوا بود انگل‌واره‌های ماده، انار آسیب دیده را برگزیدند که این موضوع می‌تواند تأییدکننده تأثیر آسیب به گیاه، حتی به صورت فیزیکی، بر جلب انگل‌واره‌ها باشد. طبق پژوهش‌های انجام شده، زنبور انگل‌واره *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Braconidae) در آزمایش انجام شده در بویایی سنج Y شکل، توانایی تشخیص گیاه سالم و گیاه آسیب دیده را داشت و زنبورهای مورد آزمایش به سمت گیاه آسیب دیده رفتند و گیاه سالم را انتخاب نکردند (Najar-Rodrigues *et al.*, 2015) که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

## پاسخ‌های بویایی زنبور انگل‌واره به مجموعه حشره-گیاه

در مقایسه‌ی انار آلوده شکافته شده و هوا زنبورهای ماده *H. hebetor* با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($\chi 2$ =۲/۸٤ P <۰/۰۱) و نرها با اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد ($\chi 2$ =۲/۰۸، P <۰/۰۵) بازوی منتهی به انار آلوده شکافته شده را انتخاب نمودند. بین دو تیمار انار آلوده شکافته و انار آلوده بدون شکاف هم ماده‌ها و هم نرها، با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ( $\chi 2$ =۲/۷۲ P <۰/۰۱ در ماده‌ها و $\chi 2$ =۲/۷۹ P <۰/۰۱ در نرها) به سمت تیمار انار آلوده شکافته شده جلب شدند ماده‌های انگل‌واره، به طور معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($\chi 2$ =۳/۰٤۲، P <۰/۰۱) انار شکافته آلوده به لارو سن بالا را انتخاب

نمودند و نرها، در سطح احتمال ۵ درصد ( $\chi 2 = ۲/۱۳$ P $< ۰/۰۵$) انار شکافته آلوده به لارو سن آخر را برگزیدند. در سایر موارد مورد بررسی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول‌های شماره ۵ و ٦).

**جدول ۵**- پاسخ‌های بویایی ماده‌های زنبور *H. hebetor* به انتخاب‌های مختلف مرتبط با مجموعه گیاه- حشره

**Table 5.** Olfactory responses of *H. hebetor* females to different choices associated with insect- plant composition

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Infected pomegranate without disruption vs air | 19 | 17 | 9 | 0.84 $^{ns}$ |
| Infected split pomegranate vs air | 29 | 11 | 5 | < 0.01$^{**}$ |
| Infected split pomegranate vs Infected pomegranate without disruption | 28 | 11 | 6 | < 0.01$^{**}$ |
| Infected pomegranate without disruption vs non Infected pomegranate | 23 | 17 | 5 | 0.34 $^{ns}$ |
| Infected pomegranate with last instar larvae vs Infected pomegranate with second instar larvae | 29 | 10 | 6 | < 0.01$^{**}$ |

** shows treatments have significant differences at 0.01 probability level.
* shows treatments have significant differences at 0.05 probability level.
ns indicate there is no significant differences between treatments.

**جدول ٦**- پاسخ‌های بویایی نرهای زنبور *H. hebetor* به انتخاب‌های مختلف مرتبط با مجموعه گیاه- حشره

**Table 6.** Olfactory responses of *H. hebetor* males to different choices associated with insect- plant composition

| Volatile Source | No. individuals | | | P |
|---|---|---|---|---|
| | Choice 1 | Choice 2 | Neither | |
| Infected pomegranate without disruption vs air | 18 | 21 | 6 | 0.63 $^{ns}$ |
| Infected split pomegranate vs air | 26 | 13 | 7 | < 0.05$^{*}$ |
| Infected split pomegranate vs Infected pomegranate without disruption | 27 | 10 | 8 | < 0.01$^{**}$ |
| Infected pomegranate without disruption vs non In-fected pomegranate | 21 | 16 | 9 | 0.41 $^{ns}$ |
| Infected pomegranate with last instar larvae vs Infected pomegranate with second instar larvae | 25 | 12 | 8 | < 0.05$^{*}$ |

** shows treatments have significant differences at 0.01 probability level.
* shows treatments have significant differences at 0.05 probability level.
ns indicate there is no significant differences between treatments.

در بررسی حاضر، انار شکافته شده آلوده به کرم گلوگاه انار برای انگل‌واره‌ها بسیارجلب کننده بود که این موضوع به روشنی بیان کننده نقش آسیب‌های گیاهی ناشی از حمله حشرات گیاهخوار در جلب انگل‌واره می‌باشد. با توجه به نتایج اشاره شده قبلی که انار سالم و دانه‌های انار برای زنبور جلب کننده نبودند ولی انار با آسیب مکانیکی چه به تنهایی و چه همراه با لارو برای زنبور جلب‌کننده بودند این فرضیه مطرح می‌شود که پوست میوه در صورت آسیب برای زنبور می تواند جلب‌کننده باشد که اثبات این امر نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نقش مواد فرار القایی گیاهان میزبان در جستجوگری دشمنان طبیعی توسط پژوهشگران مختلف مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. به عنوان مثال کنه شکارگر *N. cucumeris* بادمجان، فلفل و گوجه‌فرنگی آلوده به تریپس *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) را به این گیاهان زمانی که تنها دچار صدمه مکانیکی شده‌اند ترجیح داد (Zhong *et al.*, 2011). همچنین زنبور *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae) به تغییرات سطح برگ ناشی از تخمریزی *P. brassicae* پاسخ داد (Blenn *et al.*, 2012). زنبور انگل‌واره تخم *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) نیز بوهای ناشی از لیمو، فلفل قرمز و انگور آلوده به میزبان خود *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) را به گیاه سالم ترجیح داد و ماده‌ها زمان بیشتری را برای جستجو در بازوی حاوی

گیاه آلوده نسبت به گیاه سالم گذراندند (Krunger *et al.*, 2008). در بخش دیگری از بررسی ما، انار آلوده بدون شکاف نتوانست انگل‌واره‌ها را جلب نماید و هیچ تفاوتی بین این تیمار و انار سالم وجود نداشت. این نتایج با یافته‌های Hosseini *et al.* (2017) مبنی بر اینکه انگل‌واره‌های لاروی جمعیت بالاتری در انارهای ترک خورده دارند، مطابقت دارد. بنابر نتایج Hosseini *et al.* (2017) انار ترک خورده طی فصل و انار ترک نخورده در زمستان جمعیت آفت را حمایت می‌کنند در نتیجه اگر در آخر فصل فقط میوه‌های ترک نخورده آلوده حذف شوند و میوه‌های ترک خورده باقی بمانند می‌توان از دشمنان طبیعی حمایت نمود. به طور کلی گیاهان زیست توده بزرگتری دارند و مقادیر بیشتری از مواد فرار را نسبت به حشرات گیاهخوار تولید می‌کنند. با این حال، زمانی‌که انگل‌واره پرگاله (Patch) گیاه میزبان را پیدا می‌کند و بر روی آن فرود می‌آید، بوهای مرتبط با گیاهخوار به عنوان یک نشانه‌ی قطعی برای فواصل کوتاه در فاز بعدی میزبان‌یابی عمل می‌کند (Afsheen *et al.*, 2008; Collaza *et al.*, 2014). نتایج ما نشان داده که بوهای فرار لارو سن بالا و فضولات برای زنبور جلب‌کننده هستند ولی ترکیبات فرار انار برای زنبور جلب‌کننده نیستند مگر آن که دچار آسیب مکانیکی یا بیولوژیک قرار گرفته باشد. به عبارت دیگر چنین به نظر می‌رسد که نقش جلب‌کنندگی ترکیبات حشره میزبان برای این انگل‌واره حداقل در فواصل نزدیک، مهم‌تر از نقش ترکیبات فرار گیاهی باشد.

**ترکیبات فرار استخراج شده از لارو سن آخر کرم گلوگاه انار و فضولات آن**

بررسی ترکیبات شیمیایی استخراج شده از لارو سن آخر کرم گلوگاه و فضولات آن، در مجموع ٤٠ ترکیب از لارو و ٤٥ ترکیب از فضولات را مورد شناسایی قرار داد که، هر یک از این ترکیبات ممکن است به تنهایی و یا به همراه سایر ترکیبات، جلب انگل‌واره به سمت میزبانش را سرعت بخشند. در جدول های شماره ۷ و ۸ به نام این ترکیبات اشاره شده است از جمله ترکیبات شناسایی شده می‌توان به ترپن‌ها (به عنوان مثال لیمونن) و آلدئیدها (به عنوان مثال نونانال، اکتانال و دکانال) اشاره نمود.

همانطور که ذکر شد زنبور انگل‌واره *H. hebetor* به بوهای ناشی از فضولات میزبان و لارو سن آخر آن به شدت جلب می‌شود. هر یک از این ترکیبات موجود در رایحه‌های میزبان و فضولات، ممکن است به تنهایی و یا به همراه سایر ترکیبات موجب جلب انگل‌واره به سمت میزبان شوند. ترکیبات به دست آمده از بررسی حاضر با بسیاری از پژوهش‌های انجام گرفته در این رابطه مشابهت داشت. یکی از ترکیبات شناسایی شده در فضولات پنتادکن (Pentadecene) بود. این ترکیب در مطالعات انجام گرفته توسط Furstenau *et al.* (2016) به عنوان یکی از ترکیبات کلیدی موجود در فضولات سوسک آرد، *Tribolium castaneum* (Herbst) که سبب جلب زنبور انگل‌وارهٔ *H. sylvanidis* می‌باشد، معرفی شده است. در بررسی ایشان ذکر شده بود که این ترکیب سبب تحریک شاخک انگل‌واره‌های ماده می‌شود. همچنین، این ترکیب در ترشحات غدد دفاعی سوسک‌های بالغ خانواده Tenebrionidaeدیده شده است (Arnaud *et al.*, 2002). علاوه بر این، ۱- نیترو ۱- پنتادکن در ترشحات غدد پیشانی موریانه‌ها نیز شناسایی شده است (Blum, 1987). احتمال دارد این ترکیب از ترشحات غدد برون‌ریز شب‌پره کرم گلوگاه باشد که توسط لاروها نیز ساخته شده و در مدفوع رهاسازی می‌شود.

**جدول ۷**- برخی از ترکیبات مهم خارج شده از بدن لارو سن آخر کرم گلوگاه انار با استفاده از روش ریز استخراج مواد فرار بر روی فاز جامد

**Table 7.** Some important compounds detected in whole body volatiles of carob moth last instar larvae using the SPME method

| No. | Compound | Retention time (Min) | Amount (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | Carbon dioxide | 1.33 | 10.27 |
| 2 | Acetonitrile | 1.55 | 4.81 |
| 3 | Hexane | 1.93 | 2.42 |
| 4 | Hexanal | 3.29 | 0.75 |
| 5 | N-ethyl-1,3-dithioisoindoline $$ 1H-Isoindole-1,3(2H)-dithione, 2-ethyl- | 4.84 | 1.66 |
| 6 | 1,3-Dihydroxy-6-methoxy-1,2,3,4,-tetrahydroquinolin-2-one | 8.49 | 1.44 |
| 7 | Cyclotetrasiloxane, octamethyl | 9.51 | 2.17 |
| 8 | dl-Limonene | 10.48 | 0.53 |
| 9 | 1-Hexanol, 2-ethyl | 10.54 | 0.81 |
| 10 | Nonanal | 12.72 | 0.66 |
| 11 | 3-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS | 13.06 | 1.00 |
| 12 | Cyclopentasiloxane, decamethyl | 14.08 | 1.71 |
| 13 | 10-Methylnonadecane | 15.40 | 0.70 |
| 14 | Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) | 18.26 | 18.40 |
| 15 | Cyclohexasiloxane, dodecamethyl | 18.84 | 0.93 |
| 16 | Tetradecane | 20.78 | 1.51 |
| 17 | 2,3,4,5,6,7-hexahydro-2,2,3-trimethyl-4-benzofuranone | 22.74 | 1.04 |
| 18 | Nonadecane | 23.26 | 0.81 |
| 19 | Hexadecane | 20.60 | 0.52 |
| 20 | Diethyl Phthalate | 25.70 | 4.35 |
| 21 | Bicyclopentyl-1,1'-diene | 26.50 | 0.66 |
| 22 | Dihydro methyl jasmonate | 27.02 | 3.84 |
| 23 | Tetracosane | 27.82 | 1.89 |
| 24 | Cyclopentadecanone, 2-hydroxy- | 30.85 | 1.07 |
| 25 | Eicosane | 42.34 | 1.36 |
| 26 | Nonacosane | 48.35 | 2.42 |
| 27 | Pentatriacontane | 51.41 | 2.42 |

**جدول ۸**- برخی ترکیبات مهم خارج شده از فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه انار با استفاده از روش ریزاستخراج مواد فرار بر روی فاز جامد

**Table 8.** Some important compounds detected in volatile last instar carob moth larval feces using the SPME method

| No. | Compound | Retention time (Min) | Amount (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | Trideuteroacetonitrile | 1.32 | 1.55 |
| 2 | Hexane | 1.56 | 1.64 |
| 3 | Acetonitrile | 1.97 | 15.66 |
| 4 | 4-Hexen-2-one l | 3.02 | 0.54 |
| 5 | 3-Hexanone - | 4.32 | 1.63 |
| 6 | 3-Hexanal | 4.54 | 2.83 |
| 7 | Pentanoic acid, 2-hydroxy-4-methyl-, methyl ester | 7.62 | 0.42 |
| 8 | Diethyleneglycol monoacetate | 7.67 | 0.06 |
| 9 | 3-Hexanol | 8.56 | 7.01 |
| 10 | (Z)-2-Heptenal | 8.72 | 0.61 |
| 11 | 1-Octen -3-ol | 9.42 | 0.72 |
| 12 | Octanal | 10.06 | 0.57 |
| 13 | dl-Limonene | 10.82 | .037 |
| 14 | 1-Hexanol, 2-ethyl | 10.88 | 0.62 |
| 15 | 1-Octanol | 12.14 | 1.16 |
| 16 | Nonanal | 13.08 | 1.02 |
| 17 | Dodecane | 15.79 | 0.61 |
| 18 | 2-Decenal, | 17.61 | 1.80 |
| 19 | Tetradecane e | 18.01 | 0.49 |
| 20 | 6-amino-2-methyl-2-heptanol | 18.05 | 1.91 |
| 21 | Tridecane | 18.55 | 1.11 |
| 22 | pentadecene | 19.24 | 1.30 |

نونانال (Nonanal)، اکتانال (Octanal) و دکانال (Decanal) سه آلدئید اشباع شده استخراج شده از فضولات لارو کرم گلوگاه بودند. قبلاً نشان داده شده که نونانال و اکتانال به صورت ترکیبی به عنوان زیان‌گر پیام باعث جلب یک انگل‌واره از خانواده Ichneumonidae با نام *Mastrus ridibundus* Gravenhorst به سمت لاروهای میزبانش، کرم سیب *Cydia pomonella* L. می‌شود (Jumean *et al*., 2005) همچنین نونانال و دکانال از فضولات حشره کامل دو گونه سرخرطومی شبدر *Apion fulvipes* Geoffroy و *A. trifolii* (L.) به دست آمد که مشخص شده بود این فضولات عامل مهم جلب زنبور انگل‌واره لارو *S. dubius* به سمت میزبانش می‌باشد (Faraone *et al*., 2017). نونانال و دکانال از ترکیبات فرومون جنسی افراد نر شب‌پره *Galleria mellonella* (L.) می‌باشند که در بررسی‌های الکتروفیزیولوژیک، مشخص شد سبب ایجاد پاسخ در شاخک‌های افراد ماده و نر زنبور *B. hebetor* می‌شوند (Dweck *et al*., 2010). نونانال از لارو کرم گلوگاه نیز استخراج شد. با توجه به بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین به نظر می‌رسد نونانال جز ترکیبات اصلی جلب زنبور انگل‌واره باشد. در پژوهشی صحرایی مشخص شد، ترکیب فرار هگزانول (3-hexen-1-ol) سبب جلب شکارگرهای *Orius tristicolor* (White) و *Stethorus punctillum* Weise به سمت تله‌های چسبنده می‌شود و سن شکارگر *Geocoris pallen* Stal. به ترکیب هگزانال (2-hexen-1-al) جلب می‌شود. در تحقیق یاد شده زنبورهای خانواده Braconidae توسط هگزانول و متیل ژاسمونات (Methyl jasmonate) جلب شدند (James, 2005). در بررسی ما هگزانول و هگزانال نیز در فضولات و به همراه هیدروکسی متیل‌ژاسمونات از لارو کرم گلوگاه انار به شناسایی شدند. در مطالعات انجام شده توسط Uefune *et al*. (2013) زنبور *Cotesia vestalis* (Haliday) انگل‌واره شب‌پره پشت الماسی کلم *Plutella xylostella* L.، به ترکیبی متشکل از سبینن (sabinene)، هپتانال (heptanal)، آلفا پینین (α-pinene) و هگزنیل استات (3-hexenyl acetate) جلب شدند و وقتی لیمونن (Limonene) به مخلوط اضافه شد، زنبورهای با تجربه تخمریزی قبلی، به مخلوط جدید تمایل بیشتری نشان دادند. اما هریک این ترکیبات به تنهایی برای زنبور جلب‌کننده نبودند. در بررسی Faraone *et al*. (2017) نیز لیمونن یکی از ترکیبات اصلی موجود در فضولات دو گونه سرخرطومی بود که سبب جلب زنبور انگل‌واره لارو *S. dubius* شد. لیمونن از گیاه گوجه فرنگی آلوده به سفید بالک *Trialeurodes vaporariorum* Westwood و آلوده به شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Meyrick) نیز به دست آمد (Silva *et al*., 2018). در بررسی حاضرنیز مونوترپن لیمونن از دو تیمار لارو سن آخر و فضولات و ترکیب هپتانال از تیمار فضولات شناسایی گردید. طی بررسی‌های انجام شده توسط Morawo & Fadamiro (2016) ترکیباتی چون اکتن ۳–ال (Octen-3-ol)، اتیل هگزانول (Ethylhexanol)، لیمونن، دکانال، تری دکان (Tridecane) و تترادکان (Tetradecane) از فضولات و لارو کرم غوزه پنبه *H. armigera* جداسازی شده‌اند که با ترکیبات به دست آمده در پژوهش حاضر هماهنگی دارد. بنابراین با مروری بر بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران مختلف، می‌توان این ترکیبات را با احتمال بالاتری، جز عوامل جلب کننده این زنبور به سمت میزبان دانست، اما اینکه کدامیک از این ترکیبات به طور قطع برای زنبور جذاب‌تر است نیاز به شناسایی ترکیبات فعال و پاسخ شاخک زنبور با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی–الکتروآنتنودتکتوگرافی دارد که در صورت وجود امکان کار با این دستگاه در داخل کشور مطمئناً نتایج این تحقیق کاربردی‌تر شده و یک گام محکم و مطمئن به سمت موفقیت کنترل بیولوژیک این آفت مهم در باغ‌های انار کشور محسوب می‌شود. در نهایت این‌که در بررسی حاضر، هم افراد نر و هم افراد ماده‌ی انگل‌واره از نظر پاسخ‌های بویایی، مورد بررسی قرار گرفتند. چرا که اگر چه معمولا افراد نر از فرومون‌های جنسی تولید شده توسط افراد ماده برای یافتن جفت مناسب استفاده می‌کنند، اما ممکن است از بوهای دیگری همچون ترکیبات فرار گیاه میزبان نیز برای پیدا کردن محل‌هایی

که احتمال حضور افراد ماده در آنجا بیشتر است، بهره‌مند شوند (Reddy & Guerrero, 2004) که مطالعه حاضر تأیید کننده این نظریه می‌باشد.

مطالعه حاضر نخستین گام به سمت درک روابط شیمیایی واسط بین زنبور *H. hebetor* و میزبان آن کرم گلوگاه انار می‌باشد. آزمایش‌های اولیهٔ این بررسی، بر روی پاسخ‌های رفتاری زنبور به سمت منابع بویایی مرتبط با میزبان و گیاه مورد تغذیه آن، متمرکز شد و مشخص شد که مواد شیمیایی رها شده توسط فضولات، لارو سن آخر کرم گلوگاه و انار دچار آسیب، چه توسط آفت و چه به صورت مکانیکی، سبب جلب زنبور می‌شود. در گام بعدی مواد فرار موجود در فضولات و لارو سن آخر کرم گلوگاه استخراج شده و توسط تکنیک گازکروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی شناسایی شد.

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد، در ارتباط با انگل‌واره‌های عمومی همچون *H. hebetor* پاسخ‌های زنبور وابستگی چندانی به میزبان گیاهی ندارد و احتمالاً این انگل‌واره‌ها از علایم شیمیایی مربوط به میزبان خود که در این مطالعه کرم گلوگاه انار بود، بیشتر استفاده می‌نمایند. بنابراین استفاده از زیان‌گر پیام‌ها برای جلب این گونه زنبور به سمت میزبان گیاهخوار، می‌تواند مؤثرتر از استفاده از مواد فرار گیاهی باشد. قدم‌های بعدی می‌تواند شامل: شناسایی ترکیبات فعال با استفاده از گازکروماتوگرافی-الکتروآنتنوگرافی و بررسی این ترکیبات از نظر امکان کاربرد آن‌ها در شرایط باغی باشد. بررسی جزئیات بیشتر در خصوص نقش علایم شیمیایی در رفتارهای میزبان‌یابی این انگل‌واره، ما را در فهم هر چه بیشتر جنبه‌های تئوریکی و کاربردی تعاملات موجود بین گیاه، آفت، انگل‌واره رهنمون خواهد کرد.

**References**

**Afsheen, S., Xia, W., Ran, L., Chuan-Shu, Z. & Yong-Gen, L.** (2008) Differential attraction of parasitoids in relation to specificity of kairomones from herbivores and their by-products. *Journal of Insect Science* 15, 381-397.

**Agelopoulos, N. G., Dicke, M. & Posthumus, M. A.** (1995) Role of volatile infochemicals emitted by feces of larvae in host-searching behavior of parasitoid *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae): A behavioral and chemical study. *Journal of Chemical Ecology* 21, 1789-1811.

**Ahmadi, K., EbadZade, H., Abdshah, H., Kazemian, A. & Rafiei, M.** (2018) *Minstry of agriculture-jahad statistics.* 1th ed. 116 pp. Ministry of agriculture-jahad publication. [In Persian].

**Aleosfoor, M., Ehteshami, F. & Fekrat, L**. (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* 46, 37-87.

**Arnaud, L., Lognay, G., Verscheure, M., Leenaers, L., Gaspar, C. & Haubruge, E**. (2002) Is dimethyldecanal a common aggregation pheromone of *Tribolium flour* beetles. *Journal of Chemical Ecology* 28(3), 523-532.

**Attaran, M. R**. (1996) *Effect of laboratory hosts on biological attributes of parasitoid wasp*

*Bracon hebetor Say*. M.Sc. Thesis. 77 pp**.** Tarbiat Modares University, Tehran, [in Persian with English Summary].

**Blenn, B., Bandoly, M., Kueffner, A., Otte, T., Geiselhardt, S., Fatouros, N. E. & Hilker, M**. (2012) Insect egg deposition inducesindirect defense and epicuticular wax changes in Arabidopsis thaliana. *Journal of Chemical Ecology* 38, 882-892.

**Blum, M.** (1987) Biochemical defenses of insects. pp. 465-513 in Rockstein, M. (Ed). *Biochemistry of Insects.* 649 pp. Academic Press.

**Colazza, S., Cusumano, A., Lo Giudice, D. & Peri, E**. (2014) Chemo-orientation responses in hymenopteran parasitoids induced by substrate-borne semiochemicals. *BioControl* 59, 1-17.

**Darwish, E., El-Shazly, E. & El-Sherif, H.** (2003) The choice of probingsites by *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foraging for *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research* 39, 265-276.

**Davoudi Dehkordi, S., Seraj, A. A. & Avand-Faghih. A**. (2019) Olfactory response of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to *Helicoverpa armigera* and its two host plants. *Journal of Entomological Society of Iran* 39(3), 227-240.

**De Rijk, M., Krijn, M., Jenniskens, W., Engel, B., Dicke, M. & Poelman, E. H.** (2016) Flexible parasitoid behaviorovercomes constraint resulting from position of host and non-host herbivores. *Animal Behaviour* 113, 125-135.

**Dweck., H. K. M., Svensson, G. P., Gündüz, E. A. & Anderbrant, O.** (2010) Kairomonal Response of the parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the male-produced sex pheromone of its host, the Greater Waxmoth, *Galleria melonella* (L.). *Journal of Chemical Ecology* 36, 171-178.

**Faal Mohammad Ali, H. & Shishehbor, P.** (2013) Biological parameters of *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae): effect of host diet. *Journal of Crop Protection* 2 (4), 411-419.

**Faraone, N., Svensson, G. P. & Anderbrant, O.** (2017) Attraction of the larval parasitoid *Spintherus dubius* (Hymenoptera: Pteromalidae) to feces volatiles from the adult *Apion* weevil host. *The Journal of Insect Behavior* 30(1), 119-129.

**Farrar, N., Zamani, A. A., Moeini Naghade, N., Hghani, M. & Azizkhani, A.** (2017) Effects of trophic levels on host-finding behavior of *Pales murina* a tachinid parasitoid of *Streblote siva*. *Biological control of pest and plant diseases* 6(2), 233-243.

**Furstenau, B., Adler, C., Schulz, H. & Hilker, M**. (2016) Host Habitat Volatiles Enhance the Olfactory Response of the Larval Parasitoid *Holepyris sylvanidis* to Specifcally Host-Associated Cues. *Chemical Senses* 41 (7), 611-621.

**Gladbach, D. J., Holzschuh, A., Scherber, C., Thies, C., Dormann, C. F. & Tscharntke, T.** (2011) Crop-noncrop spillover: Arable fields affect trophic interactions on wild plants in surrounding habitats. *Oecologia* 166, 433-441.

**Gunduz, E. E. A. & Gulel, A.** (2005) Effect adult age and host species on development period of parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hym.: Braconidae). *OMU Ziraat Fakulty Dergisi* 20, 31-36.

**Hilker, M. & McNeil, J.** (2008) Chemical and behavioral ecology in insect parasitoids: how to behave optimally in a composition odorous environment. pp. 95-112 in Wajnberg, E., Bernstein, C. & Alphen, J. (Eds) *Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: From Theoretical Approaches to Field Applications*. 464pp. Wiley-Blackwell Publishing

**Hosseini, S. A., Goldansaz, S. H., Fotoukkiaii, S. M. & Groot, A.** (2017) Seasonal pattern of infestation by the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in pomegranate cultivars. *Crop Protection* 102, 19-24.

**James, D. G.** (2005) Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plan volatiles asattractants for beneficial insects. *Journal of Chemical Ecology* 31, 481-495.

**Jumean, Z., Gries, R., Unruh, T., Rowland, E. & Gries, G.** (2005) Identifcation of the larval aggregation pheromone of codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemical Ecology* 31(4), 911-924.

**Kishani Farahani, H., Goldansaz, S. H., Sabahi, G. & Shakeri, M.** (2011) Larval parasitoids of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep.: Pyralidae) in three regions of Iran: Varamin, Qom, and Saveh. *Iranian Journal of plant protection science* 41(2), 337-344

**Krugner, R., Johnson, M. W., Daane, K. M. & Morse, J. G.** (2008) Olfactory responses of the egg parasitoid, *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae), to host plants infested by *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae). *Biological Control* 47, 8-15.

**Mattiacci, L. & Dicke, M.** (1995) The parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae) discriminates between first and fifth larval instars of its host *Pieris brassicae* on the basis of contact cues from frass, silk and herbivore-damaged leaf tissue. *Journal of Insect Behavior* 8, 485-497.

**Mbata, G. N., Eason, J., Payton, M. E. & Davis, M. F.** (2017) Putative host volatiles used by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to locate larvae *of Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Behavior* 30(3), 287-299.

**Mehrnejad, M. R.** (1992) *Study on Apomyelois ceratoniae Zeller (Lep.: Pyralidae) new pest of pistachio in Kerman province.* M.Sc. Thesis. 108 pp. Tehran University, College of Agriculture. [In Persian with English summary]

**Mehrnejad, M.** (2002) Biology of carob moth, *E. ceratoniae* new pest on pistachio in Rafsanjan. *Applied Entomology and Phytopathology* 60, 1-11.

**Morawo, T. & Fadamiro, H.** (2016) Identification of key plant-associated volatiles emitted by *Heliothis virescens* larvae that attract the parasitoid, *Microplitis croceipes*: implications for parasitoid perception of odor blends. *Journal of Chemical Ecology* 42(11), 1112-1121.

**Najar-Rodriguez, A. J., Friedli, M., Klaiber, J. & Dorn, S.** (2015) Aphid-deprivation from Brassica plants results in increased isothiocyanate release and parasitoid attraction. *Chemoecology* 25, 303-311.

**Nay, J. E.** (2006) *Biology, Ecology and management of the carob moth, Ectomyelois ceratoniae (Zeller) (Lepidoptera: pyralidae), a pest of date, Poenix dactylifera L. in southern California.* Ph.D. Thesis. 278pp. University of California, Riverside

**Ozgen, M., Durgac, C., Serce, S. & Kaya, C.** (2008) Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry* 111, 703-706.

**Reddy, G. V. & Guerrero, A.** (2004) Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* 9(5), 253-261.

**SAS Institute Inc**. 2013. SAS/ Stat users Guide, version 9.4 SAS Institute Inc, Cary, NC.

**Shah Alam, M. D., Zinnatul Alam, M. D., Nurul Alam, S., Ramiz Uddin Miah, M., Mian , H. & Mofazzal Hossain, M**. (2016). Mass rearing of *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae) on wax moth, *Galleria mellonella* (Lep.: Pyralidae) with varying density of parasitoid and the host. *Journal of Crop Protection* 5 (1), 39-48.

**Silva, D. B., Bueno, V. P., Van Loon, J. J. A., Fernanda, M., Peñaflor, G. V., Bento, J. M. S. & Van Lenteren, J. C.** (2018) Attraction of three Mirid predators to Tomato Infested by both the tomato leaf mining Moth *Tuta absoluta* and the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Chemical Ecology* 44 (1), 29-39.

**Soyelu, O. J.** (2014) Behavioral responses of *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) to honey-based diets. *American Journal of Experimental Agriculture* 4(6), 703-712.

**Tang, Q.** (2016) Olfactory responses of *Theocolax elegans* (Hymenoptera, Pteromalidae) females to volatile signals derived from host habitats. *Journal of Hymenoptera Research* 49, 95-109.

**Tang, Q. F., Wu, Y. J., Liu, B. M. & Yu. Z. L.** (2009) Olfactory responses of *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) to volatile signals derived from host habitats. *Philippine Agricultural Scientist* 92(2), 133-142.

**Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., Heath, R. R., Proveaux, A. T. & Doolittle, R. E.** (1991) Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* to the microhabitat of one of its, hosts. *Journal of Chemical Ecology* 17, 2235-2251.

**Uefune, M., Kugimiya, S., Ozawa, R. & Takabayashi, J.** (2013) Parasitic wasp females are attracted to blends of host-induced plant volatiles: do qualitative and quantitative differences in the blend matter*? F1000Research* 2(57), 1-10.

**Vet, L. E. M. & Dicke, M.** (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37, 141-172.

**Zhong, F., He, Y., Gao, Y., Qi, G., Zhao, C. & Lu, L.** (2011) Olfactory response of *Neseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) to odors of host plants and *Franklinell occidetalis* plant compositions. *Arthropod-Plant Intractions* 5, 307-314.