

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی امکان ذخیره‌سازی شفیره‌ها و حشرات کامل زنبور پارازیتوئید

Bracon hebetor Say در سرما

علی افشاری^{۱*} - الهام حمزه‌پور چناری^۲ - علی ایرجی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴

چکیده

ذخیره‌سازی در دمای پایین یکی از مراحل مهم پرورش انبوه زنبور پارازیتوئید *Bracon hebetor* Say در انسکتاریوم‌ها به شمار می‌رود. در این پژوهش، شفیره‌های ۵ روزه و حشرات کامل یک‌روزه‌ی این زنبور برای مدت‌زمان‌های مختلف شامل صفر (شاهد)، ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز در شرایط یخچال (دمای پنج درجه‌ی سلسیوس و تاریکی مطلق) ذخیره و تأثیر سرما بر پارامترهای مختلف زیستی و تولیدمثلی زنبور ارزیابی شد. در ذخیره‌سازی‌های ۳۰ روزه و بیش‌تر از آن، صد درصد شفیره‌ها مردند در حالی که پس از یک هفته ذخیره‌سازی، نزدیک به ۹۳ درصد شفیره‌ها به حشره‌ی کامل تبدیل شدند که با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. با این وجود، ذخیره‌سازی شفیره‌ها در سرما حتی به مدت یک هفته باعث کاهش چشمگیر طول عمر (۵۵/۸ درصد) و باروری (۵۳/۴ درصد) زنبورهای خارج شده نسبت به شاهد گردید. ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور در یخچال متناسب با مدت‌زمان ذخیره‌سازی، بر زنده‌مانی آن‌ها تأثیر منفی گذاشت. بیش‌ترین تلفات زنبورهای ماده (۹۷ درصد) پس از ۶۰ روز ذخیره‌سازی مشاهده گردید در حالی که در ذخیره‌سازی‌های یک و دو هفته‌ای به ترتیب ۴/۴۲ و ۹/۱۲ درصد زنبورهای ماده دچار تلفات شدند. برخلاف شفیره‌ها، ذخیره‌سازی زنبورهای ماده در یخچال بر طول عمر و میزان تخمگذاری افراد زنده‌مانده تأثیر منفی نداشت. بر اساس نتایج این پژوهش، ذخیره‌سازی شفیره‌های زنبور *B. hebetor* حتی به مدت یک هفته در یخچال توصیه نمی‌شود اما زنبورهای ماده را به مدت یک هفته می‌توان در یخچال ذخیره نمود. نتایج این مطالعه در پرورش انبوه و ذخیره‌سازی این زنبور پارازیتوئید در انسکتاریوم‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ذخیره‌سازی در سرما، زنبور *B. hebetor*، کنترل بیولوژیک

مقدمه

به‌ویژه کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) در سطح مزارع مختلف از جمله پنبه، گوجه‌فرنگی و سویا رهاسازی می‌شود (۱، ۳، ۸ و ۳۹).

ذخیره‌سازی در دمای پایین (سرما) که سابقه‌ی آن به بیش از ۸۵ سال پیش بر می‌گردد (۲۵)، یک مرحله‌ی ضروری در فرایند پرورش انبوه و تجاری دشمنان طبیعی در انسکتاریوم‌ها به شمار می‌رود (۳۰ و ۳۱). در این مرحله، دشمن طبیعی پیش از رهاسازی در مزرعه و تا زمان رسیدن جمعیت آن به تعداد کافی، در دمای پایین (معمولاً بین صفر تا ۱۵ درجه‌ی سلسیوس) ذخیره می‌شود تا متابولیسم و تغذیه‌ی آن به طور موقت متوقف گردد (۱۶، ۳۰ و ۳۱). این تکنیک باعث افزایش ماندگاری دشمن طبیعی پرورش یافته شده و در نتیجه، یک ذخیره‌ی کافی و پایدار از آن برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک فراهم می‌شود (۳۰، ۳۱ و ۴۹). به علاوه، ذخیره‌سازی انبوه این امکان را فراهم می‌سازد که در زمان طغیان آفت در مزرعه، رهاسازی دشمن طبیعی با سرعت و به تعداد کافی انجام گیرد و بدین

زنبور *Bracon hebetor* Say یکی از شناخته‌شده‌ترین و مؤثرترین پارازیتوئیدهایی است که در اغلب نقاط دنیا به عنوان یک عامل بیولوژیک جهت کنترل آفات باله‌لکدار بویژه خانواده‌های Noctuidae، Pyralidae و Gelechiidae مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۲۳، ۲۴، ۲۶ و ۴۸). این زنبور لاروهای سنبل آخر میزبان را ابتدا با تزریق زهر فلج کرده و سپس روی سطح بدن آن‌ها به شکل گروهی تخمگذاری می‌کند (۲۳، ۲۴، ۴۴ و ۴۵). در ایران این زنبور پارازیتوئید همه ساله در تعداد زیادی از انسکتاریوم‌های خصوصی و دولتی به شکل انبوه تکثیر می‌یابد و به منظور کنترل آفات مختلف

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی و دانشجوی سابق کارشناسی گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(Email: Afshari@gau.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jpp.v34i1.81841

مردند. در مقابل، طول عمر زنبورهای ماده، زنده‌مانی مراحل نارس و نسبت جنسی نتاج نسل بعد تحت تأثیر سرما قرار نگرفتند (۳۵). علاوه بر دما و مدت زمان ذخیره‌سازی، تأثیر مرحله‌ی نشوونمایی این زنبور نیز بر میزان مقاومت آن به سرما مطالعه و تخم‌ها، لاروها و شفیره‌های آن در مقایسه با حشرات کامل به سرما حساس‌تر گزارش شده‌اند (۷، ۴ و ۱۱).

در ایران تاکنون مطالعات معدودی در خصوص ذخیره‌سازی زنبور *B. hebetor* در سرما انجام شده است. نتایج موسی‌پور و همکاران (۳۷) نشان داد که تا ۴ هفته ذخیره‌سازی حشرات ماده‌ی این زنبور در دمای ۱۲ درجه‌ی سلسیوس، بر زنده‌مانی و طول عمر زنبورهای ماده تأثیر منفی نداشت. همچنین، موسی‌پور و همکاران (۳۶) با ذخیره‌سازی شفیره‌های این زنبور در دماهای پایین نشان دادند که شفیره‌های این زنبور را می‌توان به مدت یک هفته در دمای ۹ درجه‌ی سلسیوس ذخیره کرد. اما ذخیره‌سازی شفیره‌ها در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس، باعث بروز تلفات شدید در آن‌ها شد. نتایج مطالعه‌ی افشاری و نظری (۱) نشان داد که تغذیه‌ی حشرات کامل این زنبور از آب‌عسل باعث افزایش مقاومت آن‌ها به سرما و بیش‌تر شدن زادآوری و طول عمر آن‌ها پس از سپری شدن دوره‌ی سرمادهی می‌شود.

با توجه به ضرورت ذخیره‌سازی جمعیت‌های پرورشی زنبور پارازیتوئید *B. hebetor* در انسکتاریوم‌ها و لزوم بررسی واکنش جمعیت‌های بومی مناطق مختلف ایران به سرما، این پژوهش با هدف بررسی جامع اثرات کشنده و زیرکشنده‌ی سرما (دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس) بر حشرات کامل و شفیره‌های این زنبور انجام شد. نتایج این پژوهش می‌تواند با تکمیل ساختن اطلاعات قبلی، در ذخیره‌سازی حشرات کامل و شفیره‌های این زنبور در انسکتاریوم‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مکان انجام تحقیق

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۵ در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

پرورش حشرات

الف) میزبان جایگزین

در این پژوهش از لاروهای شب‌پره‌ی مدیترانه‌آرد، *Anagasta kuhniella* (Zeller) به عنوان میزبان جایگزین برای پرورش زنبور *B. hebetor* استفاده شد. مطابق روش یزدانیان و همکاران (۵۱) از

ترتیب، شانس موفقیت برنامه‌ی کنترل بیولوژیک به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۳، ۱۵، ۱۷ و ۱۸).

اگر چه ذخیره‌سازی در سرما بخش مهمی از فرایند پرورش انبوه دشمنان طبیعی در انسکتاریوم‌ها به شمار می‌رود و منافع زیادی برای پرورش‌دهندگان به دنبال دارد (۳۰ و ۳۱)، اما سرمای شدید و طولانی‌مدت ممکن است بر جنبه‌های مختلف زندگی دشمنان طبیعی بویژه پارازیتوئیدها اثرات منفی نیز به دنبال داشته باشد (۱۶). تأثیر منفی قرار گرفتن در معرض سرمای طولانی‌مدت بر باروری، طول عمر، نسبت جنسی و طول دوره‌ی نشوونمای پارازیتوئیدها در مطالعات مختلف گزارش شده است (۱۰، ۱۲، ۱۷، ۲۱، ۲۲، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴ و ۴۰). به‌طور کلی، مقاومت پارازیتوئیدها به سرما فرایند پیچیده‌ای می‌باشد که مجموعه‌ی متنوعی از عوامل بیرونی (غیرزنده) مانند دما و طول مدت ذخیره‌سازی و عوامل درونی (زیستی) مانند وضعیت تغذیه، جنسیت، سن و مرحله‌ی نشوونمایی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱ و ۱۶). ثابت یا نوسان‌دار بودن دمای ذخیره‌سازی نیز بر شدت صدمات ناشی از سرما مؤثر گزارش شده است به‌طوری‌که اگر پارازیتوئید در طول ذخیره‌سازی، به‌طور منظم و دوره‌ای دمایی بالاتر از دمای ذخیره‌سازی را تجربه کند، از اثرات منفی سرما بر او کاسته خواهد شد (۳۲ و ۳۳). بنابراین، برای حفظ کیفیت پارازیتوئیدهای ذخیره‌سازی شده در سرما لازم است علاوه بر انتخاب دمای مناسب برای ذخیره‌سازی، مدت زمان سرمادهی و مرحله‌ی نشوونمایی مناسب برای ذخیره‌سازی نیز به درستی انتخاب شوند. با این حال، کارایی ذخیره‌سازی پارازیتوئیدها در دماهای پایین اغلب توسط برآیند دو عامل دما و طول مدت ذخیره‌سازی تعیین می‌شود (۱۲، ۱۳ و ۱۶) که در برخی منابع، از واژه‌ی دز سرمادهی^۱ به منظور نشان دادن برآیند این دو عامل استفاده شده است (۲۹).

در زمینه‌ی ذخیره‌سازی زنبور *B. hebetor* در سرما تاکنون چندین گزارش منتشر شده است: نتایج یک بررسی نشان داد که پس از یک ماه ذخیره‌سازی حشرات ماده‌ی این زنبور در دمای یخچال، قدرت پارازیتیسیم آن‌ها کاهش یافت اما در میزان پارازیتیسیم نتاج نسل بعد تغییری مشاهده نشد. همچنین، ذخیره‌سازی زنبورهای ماده در سرما بر طول دوره‌ی نشوونمای مراحل نارس تأثیر منفی گذاشت اما بر نسبت جنسی نتاج نسل‌های اول و دوم تأثیر معنی‌دار نداشت (۱۲). نتایج یک بررسی دیگر نشان داد که ماده‌های در حال دیپاپوز این زنبور نسبت به ماده‌های بدون دیپاپوز به سرما مقاوم‌تر بودند و تا ۸ هفته امکان ذخیره‌سازی آن‌ها در یخچال وجود داشت (۱۳). در یک مطالعه‌ی دیگر، پس از سه ماه ذخیره‌سازی حشرات کامل این پارازیتوئید در دمای ۱۲ درجه‌ی سلسیوس، بیش از ۵۰ درصد افراد

1- Dose of cold exposure

روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. پس از سپری شدن مدت زمان در نظر گرفته شده برای هر تیمار، شفیره‌های مربوط به آن تیمار از یخچال خارج و پس از انتقال به درون ژرمیناتور (شرایط ذکر شده در بالا)، درصد تفریح آن‌ها (درصد خروج حشرات کامل) و جنسیت زنبورهای خارج شده (بر اساس وجود یا عدم وجود تخم‌ریز در انتهای شکم) به طور جداگانه اندازه‌گیری و ثبت گردید.

به منظور بررسی تأثیر سرما بر طول عمر و زادآوری زنبورهای خارج شده از شفیره‌های ذخیره‌سازی شده در سرما (اثرات زیرکشنده سرما)، تعداد ۲۰ جفت زنبور نر و ماده به طور تصادفی از میان زنبورهای خارج شده از شفیره‌های ذخیره شده در سرما انتخاب شدند و طور مجزا درون ۲۰ عدد لیوان یک بار مصرف پلاستیکی (به قطر دهانه‌ی ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر) نگهداری شدند (هر جفت زنبور به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد). روزانه تعداد ده عدد لارو سن چهارم یا پنجم شب‌پره‌ی مدیریت‌شده‌ی آرد به عنوان میزبان و نیز مقداری آب عسل ۳۰ درصد از طریق یک قطعه پنبه‌ی خیس به عنوان غذا در اختیار زنبورهای درون لیوان‌ها قرار گرفت. در پایان هر ۲۴ ساعت، لاروها از زیر لیوان‌ها خارج و تعداد تخم‌های گذاشته شده روی آن‌ها شمارش و یادداشت گردید. این عمل تا زمان مرگ زنبورهای درون لیوان‌ها ادامه یافت و بدین ترتیب، طول عمر و تخمگذاری روزانه‌ی زنبورهای خارج شده از شفیره‌های سرمادیده اندازه‌گیری و ثبت گردید.

ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور در یخچال

پانصد عدد زنبور نر و پانصد عدد زنبور ماده‌ی یک‌روزه با استفاده از اسپیراتور از درون کلنی پرورشی زنبور جمع‌آوری شدند. سپس هر کدام از آن‌ها به ده جمعیت ۵۰ تایی تقسیم شدند و هر جمعیت به عنوان یک تکرار آزمایشی به طور جداگانه به درون یک عدد لیوان پلاستیکی شفاف به قطر دهانه‌ی ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر انتقال یافت (جمعاً ۲۰ عدد لیوان و هر کدام حاوی ۵۰ عدد زنبور در هر تیمار). دهانه‌ی لیوان‌ها با استفاده از پارچه‌ی توری سفیدرنگ مسدود و زنبورهای درون آن‌ها پیش از ورود به یخچال به مدت ۲۴ ساعت با آب عسل ۳۰ درصد تغذیه شدند. لیوان‌های حاوی زنبور پس از تغذیه با آب عسل، به درون یخچال (دمای 5 ± 1 درجه‌ی سلسیوس) منتقل و برای یک مدت زمان معین (بر حسب تیمار آزمایشی، ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) در آن‌جا نگهداری شدند. پس از سپری شدن مدت زمان مورد نظر در هر تیمار، لیوان‌های مربوط به آن تیمار از یخچال خارج شدند و پس از قرار گرفتن در شرایط اتاق، تعداد افراد مرده‌ی درون آن‌ها به طور جداگانه و به تفکیک جنسیت شمارش و ثبت گردید. زنبورهای مرده به افرادی اطلاق می‌شد که تا ۳ ساعت پس از خروج از یخچال قادر به حرکت و پرواز عادی نبودند. بر همین

مخلوط آرد و سبوس گندم (به نسبت ۳ به ۱) درون تشت‌های پلاستیکی به منظور پرورش این شب‌پره استفاده گردید. تشت‌های حاوی مخلوط آرد و سبوس گندم پس از آلوده‌سازی به تخم شب‌پره‌ی میزبان در شرایط اتاق (دمای 26 ± 2 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. لاروهای سنین آخر شب‌پره (سنین چهارم و پنجم) پس از جمع‌آوری از تشت‌های پرورش به عنوان میزبان در اختیار زنبور پارازیتوید قرار گرفتند.

ب) زنبور پارازیتوید *B. hebetor*

جمعیت اولیه‌ی پارازیتوید از یک انسکتاریوم تجاری در شهر گرگان تهیه و پس از انتقال به اتاق پرورش (دمای 26 ± 2 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی)، به مدت پنج نسل روی لاروهای شب‌پره‌ی مدیریت‌شده‌ی آرد پرورش داده شد تا یک جمعیت همسان از آن برای انجام آزمایش‌ها به دست آید. به منظور پرورش زنبور پارازیتوید از ظروف پلاستیکی (به ارتفاع ۲۵ و قطر ۱۷ سانتی‌متر) استفاده شد. بدین منظور، جمعیت اولیه‌ی پارازیتوید درون این ظرف‌ها محبوس و دهانه‌ی آن‌ها با استفاده از پارچه‌ی توری سفیدرنگ (۴۰ مش) مسدود گردید. سپس لاروهای درشت میزبان (سنین چهارم و پنجم) روی یک ورق کاغذ در اختیار زنبورهای درون ظرف قرار گرفتند. هر ۲۴ ساعت، لاروهای قدیمی میزبان با لاروهای تازه جایگزین و لاروهای پارازیته شده‌ی قدیمی درون ظروف دربار قرار می‌گرفتند و تا زمان خروج زنبورهای کامل در اتاق پرورش نگهداری می‌شدند. پس از پنج نسل پرورش، شفیره‌ها و حشرات کامل زنبور به تعداد مورد نیاز با استفاده از اسپیراتور یا به شکل دستی از کلنی جمع‌آوری و به تدریج در آزمایش‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفتند.

ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال

پانصد عدد شفیره همسن (۵ روزه) به همراه پیله‌های شفیرگی به شکل تصادفی از کلنی در حال پرورش زنبور جمع‌آوری و پس از تقسیم آن‌ها به ده جمعیت ۵۰ تایی، هر جمعیت به طور جداگانه به درون یک عدد لیوان پلاستیکی شفاف به قطر دهانه‌ی ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر منتقل گردید (هر جمعیت ۵۰ تایی شفیره به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد). دهانه‌ی لیوان‌ها با پارچه‌ی توری سفیدرنگ مسدود و لیوان‌ها برای مدت زمان معین (بر حسب تیمار آزمایشی، ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) درون یخچال (دمای 5 ± 1 درجه‌ی سلسیوس و تاریکی مطلق) نگهداری شدند. در تیمار شاهد، شفیره‌ها به جای یخچال درون ژرمیناتور (دمای 26 ± 1 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت

زمان خروج حشره‌ی کامل از آن تخم به عنوان طول دوره‌ی نشوونمای مراحل نارس زنبور اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار (مدت زمان‌های مختلف نگهداری در یخچال شامل شاهد، ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) به طور جداگانه برای شفیره‌ها و حشرات کامل انجام شدند. ابتدا، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 13 ارزیابی گردید و سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۴۷) تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه گردیدند. برای مقایسه آماری بین گروه‌ها از آزمون تکمیلی LSD در سطح احتمال پنج درصد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

الف) ذخیره‌سازی شفیره‌ها

درصد ظهور حشرات کامل

نتایج نشان داد که ذخیره‌سازی شفیره‌های زنبور *B. hebetor* در یخچال، تأثیر معنی‌داری روی درصد ظهور حشرات کامل داشت ($F_{6,35} = 253.2, P < 0.0001$). با افزایش مدت ذخیره‌سازی، درصد ظهور حشرات کامل از شفیره‌ها کاهش یافت به طوری که در مدت‌زمان‌های ۳۰ روز و بیش‌تر از آن، تمامی شفیره‌ها تلف شدند و هیچ حشره‌ی کاملی از آن‌ها خارج نشد (شکل ۱). درصد تلفات (عدم ظهور حشرات کامل) شفیره‌هایی که به مدت ۷ روز در یخچال ذخیره شده بودند (۷/۳۳ درصد)، نسبت به شاهد (شفیره‌های نگهداری شده در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس)، اختلاف معنی‌داری نداشت، اما در مدت زمان‌های بیش از یک هفته، میزان تلفات شفیره‌ها به‌طور معنی‌داری از شاهد بیش‌تر بود.

طول عمر، نسبت جنسی و زادآوری زنبورهای خارج شده

نتایج نشان داد که ذخیره‌سازی شفیره‌ها در سرما موجب کاهش معنی‌دار طول عمر زنبورهای نر و ماده‌ی خارج شده از آن‌ها گردید (به ترتیب، $F_{3,76} = 49.8, P < 0.0001$ و $F_{3,76} = 39.2, P < 0.0001$). به علاوه، ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال، نسبت جنسی (درصد افراد ماده) و زادآوری زنبورهای خارج شده را نیز به طور معنی‌داری کاهش داد (به ترتیب، $F_{3,20} = 12.02, P < 0.001$ و $F_{3,76} = 55.7, P < 0.0001$). میانگین طول عمر زنبورهای نر در تیمار شاهد، ۱۲/۴۵ روز بود اما با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی از طول عمر آن‌ها کاسته شد و به ۲/۴ روز در تیمار ۲۱ روز رسید. میانگین طول عمر زنبورهای ماده در تیمار شاهد، ۲۶/۸ روز بود اما با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال از طول عمر زنبورهای ماده‌ی خارج

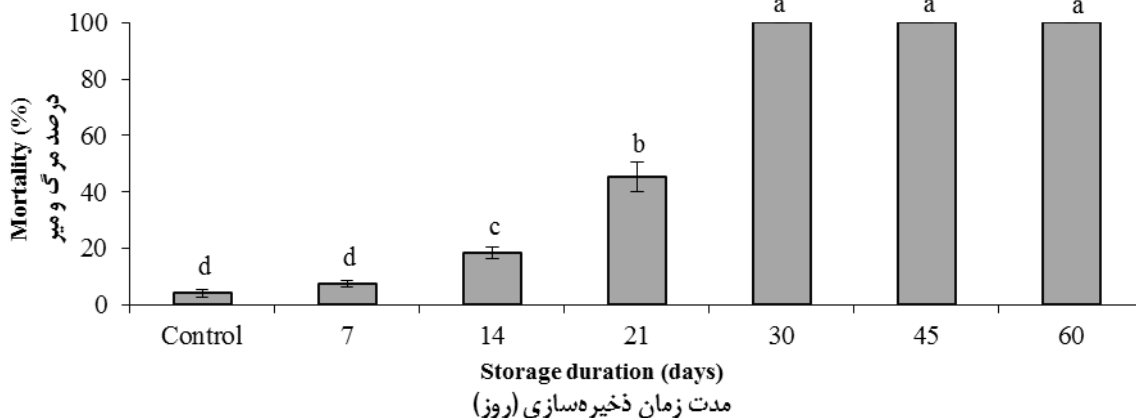
اساس، تعداد معدودی از زنبورهایی که پس از این مدت زمان تنها قادر به حرکت دادن دست و پا یا شاخک‌های خود بودند اما قادر به حرکت عادی نبودند نیز جزو افراد مرده شمارش می‌شدند. لیوان‌های مربوط به تیمار شاهد به جای یخچال در درون ژرمیناتور (دمای 26 ± 1 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند.

به منظور بررسی تأثیر سرما بر طول عمر و زادآوری (میانگین روزانه‌ی تخمگذاری) زنبورهای مادری ذخیره‌سازی شده در یخچال از میان زنبورهای زنده مانده در پایان هر مدت زمان، تعداد ۳۰ جفت زنبور نر و ماده به طور تصادفی انتخاب و هر جفت (به عنوان یک تکرار) به طور جداگانه درون یک عدد لیوان به ابعاد ذکر شده در بالا قرار داده شدند. دهانه‌ی لیوان‌ها با استفاده از پارچه‌ی توری مسدود و به شکل وارونه در کف یک سینی سفید پلاستیکی قرار گرفتند. لیوان‌های حاوی زنبورهای پارازیتوید درون ژرمیناتور (با شرایط ذکر شده در بالا) نگهداری شدند. روزانه و تا زمان مرگ زنبور ماده‌ی درون هر لیوان، تعداد ده عدد لارو سن بالای شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد (سن‌های چهارم یا پنجم) در اختیار زنبورهای درون لیوان قرار گرفتند. همچنین، زنبورهای درون لیوان‌ها به طور مرتب و با استفاده از یک قطره‌چکان و به روش اشاره شده در بالا با آب‌عسل تغذیه شدند. به طور روزانه و منظم، برش‌های کاغذی حاوی لاروهای میزبان با برش‌های حاوی لاروهای تازه‌ی میزبان جایگزین شدند و تعداد تخم‌های گذاشته شده روی لاروهای قدیمی شمارش و یادداشت گردید. بدین ترتیب علاوه بر طول عمر زنبورهای نر و ماده، میانگین تخمگذاری روزانه‌ی زنبورهای ماده در هر تیمار نیز اندازه‌گیری و ثبت گردید.

به منظور اندازه‌گیری درصد خروج حشرات کامل زنبور (درصد تفریح شفیره‌ها) و نسبت جنسی زنبورهای خارج شده در نتاج نسل بعد (F_1)، لاروهای میزبان پارازیته شده توسط زنبور به طور جداگانه (به تفکیک تیمار، شماره‌ی تکرار و روز) درون پتری‌های پلاستیکی به قطر دهانه‌ی ده سانتی‌متر قرار گرفتند و تا زمان خروج زنبورهای کامل نسل بعد، درون ژرمیناتور نگهداری شدند. پس از خروج زنبورها، تعداد آن‌ها به تفکیک جنسیت شمارش و یادداشت گردید. همچنین، به منظور پی بردن به تأثیر احتمالی سرما بر طول دوره‌ی نشوونمای مراحل نارس زنبور (فاصله‌ی زمانی گذاشته شدن تخم روی لارو میزبان تا خروج حشره‌ی کامل زنبور) در هر کدام از تیمارها، ۵۰ عدد تخم تازه گذاشته شده‌ی پارازیتوید به همراه لارو میزبان مربوط به آن به طور جداگانه درون ظروف پتری به قطر ده سانتی‌متر قرار داده شدند (یک عدد تخم پارازیتوید روی یک عدد لارو میزبان درون یک عدد پتری) و پتری‌ها تا زمان تبدیل تخم‌ها به حشره‌ی کامل درون ژرمیناتور با شرایط دمایی ذکر شده در بالا، نگهداری شدند. فاصله زمانی بین لحظه‌ی گذاشته شدن تخم زنبور روی بدن لارو میزبان و

اختلاف معنی‌داری نداشت اما از تیمارهای شاهد و ۷ روز به‌طور معنی‌داری کمتر بود (جدول ۱).

شده کاسته شد و به ۴/۷ روز در تیمار ۲۱ روز رسید. در تیمار ۱۴ روز، میانگین طول عمر زنبورهای ماده ۷/۵۵ روز بود که با تیمار ۲۱ روز



شکل ۱- میانگین (±SE) درصد تلفات شفیره‌های زنبور *B. hebetor* پس از ذخیره‌سازی آن‌ها در دمای پنج درجه‌ی سلسیوس برای مدت زمان‌های مختلف

میانگین‌های دارای حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Figure 1- Mean (±SE) mortality percent of *B. hebetor* pupae after storing at 5 °C for different durations
Means followed by same letters are not statistically different.

جدول ۱- میانگین (±SE) طول عمر، نسبت جنسی و زادآوری حشرات کامل زنبور *B. hebetor* پس از خروج از شفیره‌های ذخیره شده در دمای پنج درجه سلسیوس برای مدت زمان‌های مختلف

Table 1- Means (±SE) of longevity, fecundity and sex ratio of emerged adults of *B. hebetor* after storing pupae at 5° C for different durations (Mean±SE)

مدت زمان ذخیره‌سازی (روز) Storage duration (day)	طول عمر زنبور نر (روز) Male longevity (day)	طول عمر زنبور ماده (روز) Female longevity (day)	درصد زنبورهای ماده Female percent	زادآوری (تخم/زنبور ماده/روز) Fecundity (eggs/female/day)
0	12.45±1.17a	26.8±2.19a	72.12±2.52a	16.21±0.59a
7	5.15±0.67b	11.85±1.50b	58.33±2.63b	7.55±1.09b
14	4.30±0.33bc	7.55±0.61c	56.67±1.11b	4.26±1.11c
21	2.40±0.21c	4.70±0.58c	69.50±1.78a	1.61±0.37d

Means followed by same letters in each column are not statistically different (LSD-test, $P < 0.05$).

عدد تخم در روز بود که هر دو نسبت به شاهد کاهش چشمگیری داشتند (جدول ۱). به عبارت دیگر، ذخیره‌سازی یک، دو و سه هفته‌ای شفیره‌های این زنبور در یخچال به ترتیب موجب کاهش ۵۳، ۷۴ و ۹۰ درصدی میانگین تخم‌گذاری روزانه‌ی زنبورهای ماده‌ی خارج شده نسبت به شاهد شد.

ب) ذخیره‌سازی حشرات کامل

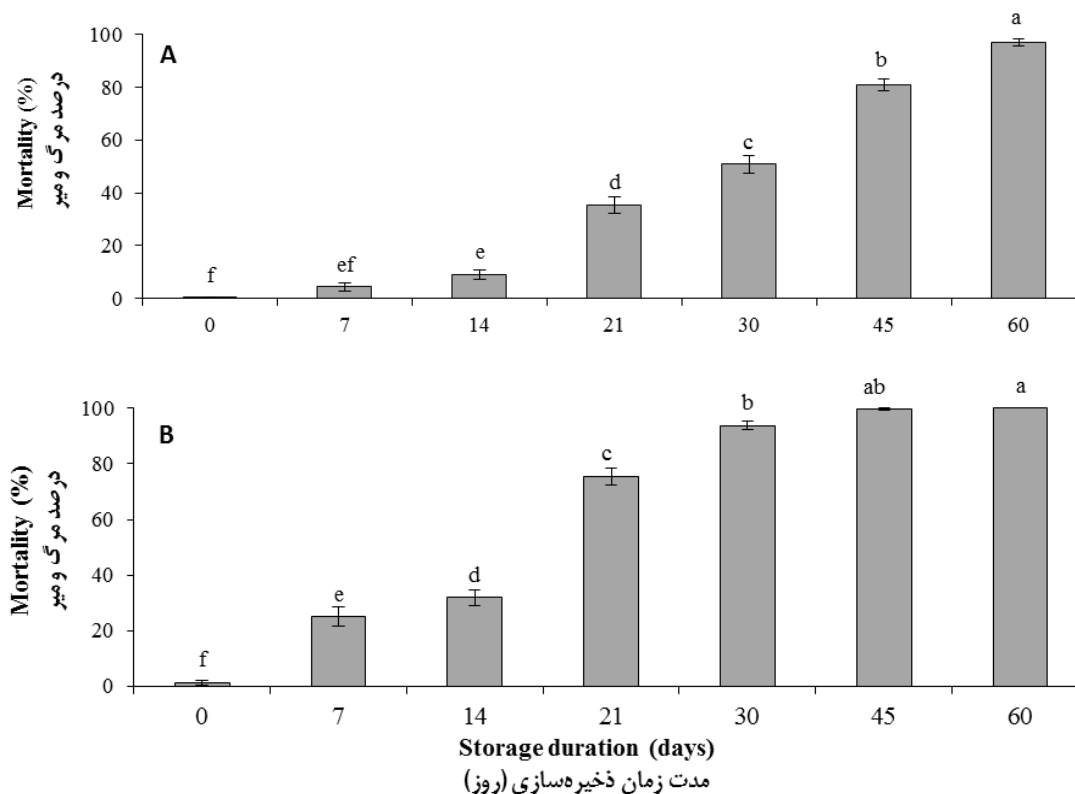
نتایج این پژوهش نشان داد که ذخیره‌سازی حشرات کامل نر و ماده در یخچال زنده‌مانی آن‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (به ترتیب، $F_{6,63} = 316.1, P < 0.0001$ و $F_{6,63} = 377.5, P < 0.0001$). با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی در یخچال، درصد تلفات زنبورهای

ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال، همچنین نسبت افراد ماده و میانگین تخم‌گذاری روزانه (زادآوری) را در بین زنبورهای خارج شده به‌طور معنی‌داری کاهش داد. به طوری که درصد زنبورهای ماده از ۷۲/۱۲ درصد در تیمار شاهد با یک کاهش معنی‌دار به ۵۶/۶۷ درصد در تیمار ۱۴ روز رسید. درصد زنبورهای ماده در تیمار ۲۱ روز، نسبت به تیمارهای ۷ و ۱۴ روز اندکی افزایش یافت و به ۶۹/۵ درصد رسید. میانگین تخم‌گذاری زنبورهای ماده‌ی خارج شده از شفیره‌ها در تیمار شاهد، ۱۶/۲۱ عدد تخم در روز بود، اما با افزایش طول مدت ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال از میانگین تخم‌گذاری زنبورها کاسته شد و به ۱/۶۱ عدد تخم در روز در تیمار ۲۱ روز رسید. در تیمارهای ۷ و ۱۴ روز، میانگین تخم‌گذاری زنبورهای ماده به ترتیب ۷/۵۵ و ۴/۲۶

طوری که میانگین طول عمر زنبورهای نر در تیمار شاهد ۴/۷ روز بود در حالی که در تیمار ۱۴ روز این مقدار به ۲۰/۳۷ روز رسید. زنبورهای ماده نیز از نظر طول عمر شرایط مشابهی داشتند به طوری که طول عمر آنها از ۱۶/۷ روز در تیمار شاهد به ۲۹/۸۷ روز در تیمار یک‌ماه رسید، هر چند که بین مدت‌زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی از این نظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. متناسب با افزایش طول عمر زنبورهای ماده‌ی ذخیره‌سازی شده در یخچال، طول دوره‌ی تخم‌گذاری آنها نیز به طور معنی‌داری بیشتر شد ($F_{4, 145} = 3.52$, $P < 0.001$) و از ۱۱ روز در تیمار شاهد به ۱۸/۵ روز رسید، اما بین تیمارهای ۱۴، ۲۱ و ۳۰ روز از این نظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

نر و ماده بیش‌تر شد به طوری که در تیمار ۶۰ روز، صد درصد زنبورهای نر و ۹۷/۱۴ درصد زنبورهای ماده تلف شدند. در مقابل، در ذخیره‌سازی یک هفته‌ای، درصد تلفات زنبورهای ماده فقط ۴/۴۲ درصد بود که با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. اما درصد تلفات زنبورهای نر در همین مدت زمان (۲۵/۰۸ درصد)، به طور معنی‌داری از شاهد بیش‌تر بود (شکل ۲).

ذخیره‌سازی زنبورهای نر و ماده در یخچال، طول عمر آنها را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (به‌ترتیب، $F_{4, 145} = 14.33$, $P < 0.0001$ و $F_{4, 145} = 5.59$, $P < 0.001$). به‌طور کلی، زنبورهای ذخیره‌سازی شده در یخچال در صورت تحمل سرما و زنده ماندن، نسبت به زنبورهای شاهد از طول عمر بیش‌تری برخوردار بودند. به



شکل ۲- میانگین (±SE) درصد مرگ و میر حشرات ماده (A) و حشرات نر (B) زنبور *B. hebetor* پس از ذخیره‌سازی آنها در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس برای مدت‌زمان‌های مختلف

میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

Figure 2- Mean (±SE) mortality percent of adult females (A) and males (B) of *B. hebetor* after their storing at 5 °C for different durations

Means followed by same letters are not statistically different.

ترتیب، $F_{4, 145} = 0.66$, $P > 0.05$ و $F_{4, 145} = 1.83$, $P > 0.05$. میانگین زادآوری زنبورهای ماده در تیمارهای شاهد و ۳۰ روز به ترتیب ۱۰/۴۲ و ۱۱/۱۶ عدد تخم به ازای هر زنبور ماده در روز محاسبه شدند که با همدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. در همین

زنبورهای ذخیره‌سازی شده در یخچال اگر چه در مقایسه با شاهد طول عمر بیش‌تری داشتند اما میانگین تخم‌گذاری روزانه‌ی و اندازه‌ی دسته‌ی تخم آنها (تعداد تخم گذاشته شده روی یک عدد لارو میزبان) در تیمارهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند (به

حال، اندازه‌ی دسته تخم زنبور هم تغییرات بسیار محدودی داشت و از ۳/۵۴ عدد تخم به ازای هر لارو میزبان در تیمار شاهد به ۳/۷۱ عدد تخم در تیمار ۳۰ روز رسید (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین (±SE) طول عمر و پارامترهای تولیدمثلی زنبور *B. hebetor* پس از ذخیره‌سازی حشرات کامل در دمای پنج درجه سلسیوس برای مدت زمان‌های مختلف

Table 2- Means (±SE) of longevity and reproductive parameters of *B. hebetor* after adults cold storage for different durations at 5° C

مدت زمان ذخیره‌سازی (روز)	طول عمر نر (روز)	طول عمر ماده (روز)	طول دوره تخمگذاری (روز)	زادآوری (عدد تخم/ماده/روز)	اندازه دسته تخم (عدد تخم/لارو میزبان)
Storage duration (day)	Male longevity (day)	Female longevity (day)	Oviposition periods (day)	Daily oviposition (eggs/female/day)	Clutch size (eggs/host larva)
0	4.70±0.67c	16.7±2.2b	11.0±1.45c	10.42±1.01a	3.54±0.18a
7	15.9±2.26ab	22.97±3.5ab	14.03±1.80bc	8.59±1.02a	3.38±0.11a
14	20.37±1.51a	28.40±2.7a	19.47±2.20a	11.45±0.95a	3.55±0.12a
21	16.80±1.90a	26.20±3.3a	15.72±1.97abc	9.74±1.27a	3.58±0.16a
30	11.07±2.2b	29.87±2.2a	18.50±1.55ab	11.16±0.96a	3.71±0.14a

Means followed by same letters in each column are not statistically different (LSD-test, $P < 0.05$).

جدول ۳- تأثیر ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور *B. hebetor* در سرما بر طول دوره نشوونمای مراحل نارس و درصد زنبورهای ماده در نتاج نسل بعد

Table 3- Effect of cold storage of adult *B. hebetor* at 5° C on immatures developmental time and female percent of offspring in F₁ generation

مدت زمان ذخیره‌سازی (روز)	میانگین (±SE) پارامترهای نشوونمایی		
	طول دوره نشوونمای مراحل نارس در زنبور نر (روز)	طول دوره نشوونمای مراحل نارس در زنبور ماده (روز)	درصد زنبورهای ماده
Storage duration (day)	Egg to male adult developmental time (day)	Egg to female adult developmental time (day)	Female percent
0	11.90±0.06a	12.80±0.06a	68.87±5.45a
7	12.77±0.06a	12.67±0.08a	71.12±4.43a
14	12.10±0.07a	12.23±0.06a	62.59±3.93a
21	12.13±0.06a	12.07±0.05a	66.32±3.25a
30	12.47±0.07a	12.37±0.07a	61.44±3.44a

Means followed by same letters in each column are not statistically different (LSD-test, $P < 0.05$).

نتاج نسل بعد در محدوده‌ی ۶۸/۸۷ درصد در تیمار شاهد تا ۶۱/۴۴ درصد در تیمار ۳۰ روز نوسان داشت (جدول ۳).

بحث

با توجه به اهمیت زنبور پارازیتوئید *B. hebetor* در کنترل بیولوژیک آفات بالپولکدار، بویژه کرم غوزه‌ی پنبه و گسترش روزافزون پرورش انبوه آن در انسکتاریوم‌های دولتی و خصوصی ایران (۱)، لازم است راهکارهایی به منظور ذخیره‌سازی کارآمد و اقتصادی این پارازیتوئید در دماهای پایین ارائه شوند. مقاومت پارازیتوئیدها به سرما فرایند پیچیده‌ای است که مجموعه‌ی متنوعی از عوامل بیرونی و درونی مانند دمای ذخیره‌سازی، طول مدت ذخیره‌سازی، مرحله‌ی نشوونمایی و وضعیت تغذیه‌ای آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۶).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اثرات ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور در یخچال فقط محدود به زنبورهای والد بود و نتاج حاصل در نسل بعد تحت تأثیر ذخیره‌سازی والدین در یخچال قرار نگرفتند. به طوری که بین طول دوره‌ی نشوونمای مراحل نارس در مدت زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($F_{4, 145} = 2.15, P > 0.05$ و $F_{4, 145} = 1.89, P > 0.05$) به ترتیب در زنبورهای نر و ماده). میانگین طول دوره‌ی نشوونمای مراحل نارس در تیمارهای مختلف از ۱۱/۹ تا ۱۲/۷۷ روز در زنبورهای نر و ۱۲/۰۷ تا ۱۲/۸ روز در زنبورهای ماده نوسان داشت (جدول ۳). همانند طول دوره‌ی نشوونما، نسبت زنبورهای ماده در نتاج نسل بعد نیز تحت تأثیر ذخیره‌سازی والدین در یخچال قرار نگرفت ($F_{4, 70} = 2.02, P > 0.05$) و میانگین درصد زنبورهای ماده در

همکاران (۲) انطباق بیش‌تری داشت که ممکن است به دلیل شباهت بیش‌تر این مطالعات از نظر سن شفیره‌های ذخیره‌سازی شده و دمای ذخیره‌سازی باشد. در این دو پژوهش، شفیره‌های مسن‌تر (سه تا چهار روزه) زنبور *B. hebetor* در یخچال (دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس) ذخیره شدند و پس از یک، دو و سه هفته ذخیره‌سازی به ترتیب ۶، ۱۰ و ۲۴ درصد شفیره‌ها از بین رفتند که این مقادیر در مقایسه با پژوهش موسی‌پور و همکاران (۳۶) به یافته‌های پژوهش حاضر نزدیک‌تر می‌باشند. به‌طور کلی به نظر می‌رسد با افزایش سن شفیره‌های ذخیره‌سازی شده، تحمل آن‌ها به سرما و در نتیجه، درصد تفریح آن‌ها بیش‌تر می‌گردد هر چند که تایید قطعی این فرضیه به انجام پژوهش‌های مستقل بیش‌تری نیاز دارد.

نتایج پژوهش حاضر در خصوص امکان ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور *B. hebetor* در یخچال نشان داد که متناسب با مدت‌زمان ذخیره‌سازی، جمعیت حشرات کامل نیز همانند شفیره‌ها دچار مرگ و میر شدند و این تلفات در زنبورهای نر به میزان قابل‌توجهی از زنبورهای ماده بیش‌تر بود. در ذخیره‌سازی‌های بلندمدت (۴۵ و ۶۰ روزه)، همانند شفیره‌ها، تقریباً صد درصد زنبورهای نر و بیش از ۸۰ درصد زنبورهای ماده از بین رفتند. در حالی که در ذخیره‌سازی یک ماهه، بر خلاف شفیره‌ها، تقریباً ۵۰ درصد حشرات کامل ماده زنده ماندند. از سوی دیگر، بر خلاف شفیره‌ها که ذخیره‌سازی آن‌ها در یخچال باعث کاهش چشمگیر طول عمر و زادآوری حشرات کامل خارج شده از آن‌ها شد، در ذخیره‌سازی حشرات کامل، سرما هیچ تأثیر منفی روی طول عمر و زادآوری افراد زنده مانده بر جای نگذاشت و حتی طول عمر زنبورهای ذخیره شده در سرما در مقایسه با زنبورهای شاهد افزایش قابل‌توجهی یافت. پیامدهای منفی ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور *B. hebetor* و پارازیتوئیدهای دیگر در سرما در مطالعات متعددی گزارش شده است (۹، ۱۳، ۱۷، ۲۱، ۴۲). تقریباً در تمام مطالعات انجام شده در خصوص ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور *B. hebetor* در سرما، اثر منفی سرما روی زنده‌مانی حشرات کامل گزارش شده است. در حالی که گزارش‌ها در خصوص اثرات منفی سرما روی سایر ویژگی‌های زیستی و تولیدمثلی زنبورهای پارازیتوئید از جمله *B. hebetor* (اثرات زیرکشنده) متناقض می‌باشند: در تعدادی از گزارش‌ها بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، اثرات زیرکشنده‌ی سرما (مانند کاهش طول عمر و تخمگذاری) بر حشرات کامل برخی از پارازیتوئیدها گزارش شده است (۴، ۹، ۳۸، ۴۱ و ۴۳). چن و همکاران (۱۲ و ۱۳) نشان دادند که میانگین تخمگذاری زنبور *B. hebetor* پس از ذخیره‌سازی طولانی‌مدت حشرات کامل آن در سرما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. خالی شدن ذخایر غذایی و آبی بدن و تجمع متابولیت‌های سمی از دلایل احتمالی این کاهش گزارش شده‌اند (۱۲ و ۴۶). شرایط دمایی و فتوپریودی پرورش زنبور پیش از ذخیره‌سازی در سرما نقش

اگرچه دماهای بین صفر تا ۱۵ درجه‌ی سلسیوس برای ذخیره‌سازی پارازیتوئیدها توصیه شده‌اند (۱۶)، اما از نظر فنی برای صاحبان انسکتاریوم‌ها و کشاورزان تأمین دمای پنج درجه سلسیوس (دمای یخچال) راحت‌تر از دماهای دیگر می‌باشد و ذخیره‌سازی‌های زنبور *B. hebetor* اغلب در این دما انجام می‌گیرد (۱). از سوی دیگر، یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر میزان تحمل پارازیتوئیدها به سرما مرحله‌ی نشوونمایی آن‌ها گزارش شده است (۴ و ۱۶). بیش‌تر تلاش‌ها برای ذخیره‌سازی این زنبور در دماهای پایین بر حشره‌ی کامل (۱، ۱۲ و ۱۳) و شفیره (۲، ۴ و ۳۶) متمرکز بوده‌اند و گزارش‌ها در خصوص ذخیره‌سازی سایر مراحل نشوونمایی بسیار محدود می‌باشد (۷ و ۱۱). نتایج پژوهش حاضر در خصوص ذخیره‌سازی شفیره‌های زنبور *B. hebetor* در دمای یخچال نشان داد که متناسب با طول مدت ذخیره‌سازی، ویژگی‌های کیفی شفیره‌ها از جمله درصد تفریح و نیز طول عمر، قدرت تخمگذاری و نسبت زنبورهای ماده‌ی خارج شده از آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافتند. اثرات منفی ذخیره‌سازی شفیره‌ها در سرما بر ویژگی‌های کیفی این زنبور در چندین پژوهش گزارش شده است (۴، ۲۰ و ۳۶). در پژوهش حاضر، درصد مرگ و میر شفیره‌هایی که به مدت یک هفته درون یخچال ذخیره شده بودند (۷/۳۳ درصد) بسیار کم‌تر از ۷۰ درصد گزارش شده توسط موسی‌پور و همکاران (۳۶) بود. همچنین در مدت‌زمان‌های دو و سه هفته نیز درصد مرگ و میر شفیره‌ها در پژوهش حاضر در مقایسه با مقادیر گزارش شده توسط موسی‌پور و همکاران (۳۶) بسیار کم‌تر بود (۱۸/۳۳ درصد در مقابل ۷۰ درصد در تیمار دو هفته و ۴۵/۳۳ درصد در مقابل ۸۰ درصد در تیمار سه هفته). در مقابل، شدت اثرات منفی ذخیره‌سازی شفیره‌ها در یخچال بر طول عمر حشرات کامل در پژوهش حاضر بیش‌تر از مقادیر گزارش شده توسط موسی‌پور و همکاران (۳۶) بود. به‌طوری‌که در پژوهش حاضر پس از یک هفته ذخیره‌سازی شفیره‌ها درون یخچال، طول عمر حشرات کامل نر و ماده‌ی خارج شده از آن‌ها به‌طور قابل‌توجه و معنی‌داری کاهش یافت در حالی که در پژوهش موسی‌پور و همکاران (۳۶) نگهداری شفیره‌ها تا دو هفته درون یخچال بر طول عمر زنبورهای خارج شده تأثیر منفی نداشت. این اختلاف‌ها ممکن است ناشی از دو عامل سن شفیره‌های ذخیره‌سازی شده و نیز دمای ذخیره شده باشند. شفیره‌های ذخیره شده در پژوهش موسی‌پور و همکاران (۳۶) یک‌روزه بودند در حالی که در پژوهش حاضر، شفیره‌های پنج روزه در یخچال ذخیره شدند. به علاوه میانگین دمای ذخیره‌سازی در پژوهش موسی‌پور و همکاران (۳۶) یک درجه‌ی سلسیوس از پژوهش حاضر کم‌تر بود (۴ درجه‌ی سلسیوس در مقابل ۵ درجه‌ی سلسیوس) که این موضوع نیز ممکن است موجب مرگ و میر بیش‌تر شفیره‌ها شده باشد.

نتایج پژوهش حاضر در خصوص اثرات منفی سرما بر شفیره‌های زنبور *B. hebetor* با یافته‌های تیمیمی و اشفق (۴۸) و عالم و

یک ارتباط خطی وجود نداشت. به علاوه، در نتایج پژوهش آن‌ها حداکثر اختلاف طول مدت نشوونما در مدت‌زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی دو روز بود که این میزان اختلاف در برنامه‌های پرورش انبوه این زنبور قابل چشم‌پوشی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ذخیره‌سازی شفیره‌های زنبور *B. hebetor* در دمای پنج درجه‌ی سلسیوس برای مدت زمان بیش از یک هفته، باعث کاهش چشمگیر درصد ظهور حشرات کامل و نیز طول عمر و میانگین تخمگذاری زنبورهای ماده گردید. در ذخیره‌سازی یک‌هفته‌ای شفیره‌ها، اگرچه درصد تفریح آن‌ها نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نداشت اما طول عمر و میانگین تخمگذاری زنبورهای خارج شده به میزان قابل‌توجهی کاهش یافت. بنابراین، ذخیره‌سازی شفیره‌های این زنبور در یخچال حتی برای یک مدت زمان کوتاه هم قابل توصیه نمی‌باشد. البته، در انسکتاریوم‌ها و کلینیک‌های گیاه‌پزشکی زنبور *B. hebetor* به شکل حشره‌ی کامل به کشاورزان تحویل داده می‌شود و ذخیره‌سازی شفیره‌ها در بعضی موارد خاص و اغلب با هدف حفظ کلنی انجام می‌گیرد که در این صورت، شفیره‌ها تا یک هفته قابل ذخیره‌سازی می‌باشند. از سوی دیگر، مقایسه یافته‌های این پژوهش با نتایج سایر پژوهش‌ها نشان داد که احتمالاً شفیره‌های مسن‌تر (۵ روزه) در مقایسه با شفیره‌های جوان (یک‌روزه) به سرما مقاوم‌تر هستند. همچنین، به دلیل تلفات کم‌تر حشرات کامل در سرما و عدم تأثیر منفی دمای پایین بر طول عمر و تخمگذاری زنبورهای ماده، به نظر می‌رسد حشرات کامل این زنبور در مقایسه با شفیره‌ها برای ذخیره‌سازی در دمای پایین مناسب‌تر می‌باشند. به طوری که حشرات کامل این زنبور را می‌توان تا یک هفته در دمای یخچال ذخیره کرد (با مرگ و میر حدود ۴ درصد). با این حال، اگر ذخیره‌سازی در سرما فقط به قصد حفظ کلنی باشد (نه فروش به کشاورزان جهت رهاسازی در مزرعه)، ذخیره‌سازی حشرات کامل این پارازیتوئید تا دو هفته هم قابل توصیه می‌باشد زیرا تلفات زنبورهای ماده پس از این مدت زمان به حدود ۹ درصد می‌رسد که با وجود داشتن اختلاف معنی‌دار با شاهد، در پرورش انبوه و تجاری این زنبور قابل اغماض می‌باشد.

مهمی در درصد تلفات آن در طول ذخیره‌سازی ایفا می‌کند. در پژوهش حاضر، شرایط پرورش زنبور پیش از ذخیره‌سازی (دمای 26 ± 2 درجه‌ی سلسیوس؛ رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) یک شرایط غیردیپوزه بود در حالی که چن و همکاران (۱۳) نشان دادند که پرورش این زنبور در دمای بین ۲۰-۱۷ درجه‌ی سلسیوس و دوره‌ی نوری ۱۰ ساعت روشنایی به ۱۴ ساعت تاریکی (شرایط دیپوزی) موجب بروز دیپوز در زنبور و در نتیجه، افزایش تحمل آن به سرما و کاهش تلفات در حین ذخیره‌سازی در دمای یخچال می‌شود. به طور کلی، با توجه به این که زنبور *B. hebetor* زمستان را به شکل حشره کامل سپری می‌کند (۲۶ و ۲۸) لذا حشرات کامل در مقایسه با شفیره‌ها به سرما مقاوم‌تر می‌باشند (۵۰).

از سوی دیگر، نتایج برخی مطالعات مربوط به ذخیره‌سازی حشرات کامل پارازیتوئیدها در سرما (۱۴، ۱۵ و ۲۷) همانند پژوهش حاضر عدم تأثیر منفی سرما بر زادآوری پارازیتوئیدها را گزارش کرده‌اند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پارازیتوئیدهای ذخیره‌سازی شده در یخچال در صورت زنده ماندن از طول عمر بیش‌تری برخوردار بودند. در برخی از مطالعات مربوط به بررسی اثر تنش‌ها بر پارازیتوئیدها (۵ و ۱۹) از این پدیده تحت عنوان واکنش تیپ *B* یاد شده است که طی آن، شدت‌های بالای یک تنش محیطی (مثل سرما) پس از وقوع تلفات شدید در یک جمعیت، باعث گزینش بهتر افراد مقاوم‌تر به سرما می‌شود و این افراد (زنده‌مانده‌ها) از عملکرد بهتری از نظر طول عمر و تخمگذاری برخوردار می‌باشند.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، طول مدت نشوونمای مراحل نابالغ (تخم تا حشره‌ی کامل) و نسبت جنسی در نتاج نسل بعد تحت تأثیر ذخیره‌سازی زنبورهای والد در سرما قرار نگرفتند که این موضوع حاکی از آن بود که در ذخیره‌سازی حشرات کامل زنبور *B. hebetor* در یخچال، اثرات منفی سرما محدود به زنبورهای والد ذخیره‌سازی شده بودند و این اثرات به نتاج نسل بعد منتقل نشدند. همانند پژوهش حاضر، نتایج چن و همکاران (۱۲) و موسی‌پور و همکاران (۳۷) نیز نشان داد که پس از ذخیره‌سازی حشرات کامل *B. hebetor* در دمای پایین، نسبت جنسی زنبورهای خارج شده در نسل بعد تحت تأثیر سرما قرار نگرفت. چن و همکاران (۱۲) نشان دادند که طول مدت نشوونمای مراحل نارس زنبور *B. hebetor* تحت تأثیر سرما قرار گرفت اما بین طول مدت ذخیره‌سازی در سرما و طول مدت نشوونما

منابع

- 1- Afshari A., and Nazari Fandokht E. 2019. Effect of sugar concentration and feeding duration on the cold tolerance of *Bracon hebetor* Say adults. Plant Pest Research 8(4): 55-690. (In Persian with English abstract)
- 2- Alam M.S., Alam M.Z., Alam S.N., Miah M.R.U., and Mian M.I.H. 2016. Effect of storage duration on

- the stored pupae of parasitoid *Bracon hebetor* (Say) and its impact on parasitoid quality. Bangladesh Journal of Agricultural Research 41(2): 297-310.
- 3- Aliabadi A. 2015. Feeding and mating effects on cold-storage efficacy of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). M.Sc. Thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian with English abstract)
 - 4- Al-Tememi N.K., and Ashfaq M. 2005. Effect of low temperature storage on the fecundity and parasitizing efficacy of *Bracon hebetor* (Say). Journal of Agricultural Research 43(2): 155-160.
 - 5- Amice G., Vernon P., Outreman Y., van Alphen J., van and Baaren J. 2008. Variability in responses to thermal stress in parasitoids. Ecological Entomology 33: 701-708.
 - 6- Amir-Maafi M., and Chi H. 2006. Demography of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) on two pyralid hosts (Lepidoptera: Pyralidae). Annals of the Entomological Society of America 99: 84-90.
 - 7- Anwar M., Zain ul Abdin Abbas S.K., Tahir M., Hussain F., and Manzoor A. 2016. Effect of cold storage on the survival, sex ratio and longevity of ectoparasitoid, *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). Pakistan Journal of Zoology 48(6): 1775-1780.
 - 8- Attaran M.R. 1996. Effect of laboratory hosts on biological attributes of parasitoid wasp *Bracon hebetor* Say. M.S. thesis, Tarbiat Modarres University, Iran. (In Persian with English abstract)
 - 9- Ayvaz A., Karasu E., Karabörklü S., and Tunçbilek A.S. 2008. Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Journal of Stored Products Research 44: 232-240.
 - 10- Bayram A., Ozcan H., and Kornosor S. 2005. Effect of cold storage on the performance of *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). Biological Control 35: 68-77.
 - 11- Carrillo M.A., Heimpel G.E., Moon R.D., Cannon C.A., and Hutchison W.D. 2005. Cold hardiness of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of pyralid moths. Journal of Insect Physiology 51: 759-768.
 - 12- Chen H., Opit G.P., Sheng P., and Zhang H. 2011. Maternal and progeny quality of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) after cold storage. Biological Control 58: 255-261.
 - 13- Chen H., Zhang H., Zhu K.Y., and Throne J. 2013. Performance of diapausing parasitoid wasps, *Habrobracon hebetor*, after cold storage. Biological Control 64: 186-194.
 - 14- Chen M., Han Z., and Wang R. 2005. A preliminary study on effects of cold storage on pupae of *Aphidius gifuensis* Ashmead. Plant Protection 31: 41-43.
 - 15- Chen W.L., Leopold R.A., and Harris M.O. 2008. Cold storage effects on maternal and progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). Biological Control 46: 122-132.
 - 16- Colinet H., and Boivin G. 2011. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. Biological Control 58: 83-95.
 - 17- Colinet H., and Hance T. 2010. Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. Annals of Applied Biology 156: 147-156.
 - 18- Coudron T.A., Eilersieck M.R., and Shelby K.S. 2007. Influence of diet on long-term cold storage of the predator *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). Biological Control 42: 186-195.
 - 19- Desneux N., Pham-Delegue M.H., and Kaiser L. 2004. Effects of sub-lethal and lethal doses of lambda-cyhalothrin on oviposition experience and host-searching behavior of a parasitic wasp, *Aphidius ervi*. Pest Management Science 60: 381-389.
 - 20- Farghaly H.T., and Ragab Z.A. 1993. Effect of low-temperature storage on pupae of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University, 44: 697-706.
 - 21- Foerster L.A., Doetzer A.K., and de Castro L.C.F. 2004. Emergence, longevity and fecundity of *Trissolcus basalus* and *Telenomus podisi* after cold storage in the pupal stage. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 39: 841-845.
 - 22- Frere I., Balthazar C., Sabri A., and Hance T. 2011. Improvement in the cold storage of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiinae) European Journal of Environmental Sciences 1: 33-40.
 - 23- Ghimire M.N., and Phillips T.W. 2010. Suitability of different lepidopteran host species for development of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). Environmental Entomology 39(2): 449-458.
 - 24- Ghimire M.N., and Phillips T.W. 2010. Mass rearing of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera:

- Braconidae) on larvae of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): effects of host density, parasitoid density, and rearing containers. *Journal of Stored Products Research* 46: 214-220.
- 25- Hanna A.D. 1935. Fertility and tolerance of low temperature in *Euchalcidia carybori* Hanna (Hymenoptera: Chalcidinae). *Bulletin of Entomological Research* 26: 315-322.
- 26- Huang X.F. 1986. Use of *Habrobracon hebetor* Say in granary pest control. *Chinese Journal of Biological Control* 2: 78-80.
- 27- Ismail M., Vernon P., Hance T., and van Baaren J. 2010. Physiological costs of cold exposure on the parasitoid *Aphidius ervi*, without selection pressure and under constant or fluctuating temperatures. *BioControl* 55: 729-740.
- 28- Johnson J.A., Valero K.A., Hannel M.M., and Gill R.F. 2000. Seasonal occurrence of postharvested dried fruit insects and their parasitoids in a culled fig house. *Journal of Economic Entomology* 93: 1380-1390.
- 29- Kostal V., Vambera J., and Bastl J. 2004. On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Experimental Biology* 207: 1509-1521.
- 30- Leopold R.A. 1998. Cold storage on insects for integrated pest management. In: Hallman, G.J., Denlinger, D.L. (Eds.), *Temperature Sensivity in Insects and Application in Integrated Pest Management*. Westview Press, Boulder, pp. 235-267.
- 31- Leopold R.A. 2007. Colony maintenance and mass-rearing: using cold storage technology for extending shelf-life of insects. In: Vreysen, M.J.B., Robinson, A.S., and Hendrichs, J. (Eds.). *Area-Wide Control of Insect Pests*. Springer, Netherlands 149-162.
- 32- Mahi H., Rasekh A., Michaud J.P., and Shishehbor P. 2014. The biology of *Lysiphlebus fabarum* (Braconidae, Aphidiinae) following cold storage of larvae and pupae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 153: 10-19.
- 33- Mahi H., Rasekh A., and Shishehbor P. 2016. The effects of constant and fluctuating thermal regimes for reducing chill injuries during cold storage of late-instar larva of *Lysiphlebus fabarum* (Hym., Braconidae). *Journal of Plant Protection* 30: 270-283. (In Persian with English abstract)
- 34- Mahi H., Rasekh A., and Shishehbor P. 2014. Cold storage of bisexual population of *Lysiphlebus fabarum* (Braconidae: Aphidiinae). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 37 (2): 66-78. (In Persian with English abstract)
- 35- Mansour A.N. 2017. Influence of cold storage on some biological aspects of the gregarious parasitoid, bracon hebetor (Say) (hymenoptera: Braconidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 27: 205-210.
- 36- Mousapour Z., Askarianzadeh A., and Abbasipour H. 2014. Effect of cold storage of pupae parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae), on its efficiency. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47(8): 966-972.
- 37- Mousapour Z., Askarianzadeh A., and Abbasipour H. 2015. Cold storage of adult parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) and the flour moth larvae, *Anagasta kuehniella* (Zeller) at 12°C. *Plant Pest Research* 5(3): 17-29. (In Persian with English abstract)
- 38- Nadeem S., Ashfaq M., Hamed M., and Ahmed S. 2010. Optimization of short and long term storage duration for *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) at low temperatures. *Pakistan Journal of Zoology* 42(1): 63-67.
- 39- Najafi Navaei I., Taghizadeh M., Javanmoghaddam H., Oskoo T., and Attaran M.R. 2002. Efficiency of parasitoid wasps, *Trichogramma pintoii* and *Habrobracon hebetor* against *Ostrinia nubilalis* and *Helicoverpa* sp. on maize in Moghan. *Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress*. Razi University of Kermanshah, Iran, p.327.
- 40- Okine J.S., Mitchell E.R., and Hu G.Y. 1996. Low temperature effect on viability of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) pupae and effect of this parasitoid on feeding rate of diamondback moth larvae (Lepidoptera: Plutellidae). *Florida Entomologist* 79: 503-509.
- 41- Ozder N. 2004. Effect of different cold storage periods on parasitization performance of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Biocontrol Science and Technology* 14(5): 441-447.
- 42- Pitcher S.A., Haffmann M.P., Gardner J., Wright M.G., and Kuhar T.P. 2002. Cold storage of

- Trichogramma ostriniae* reared on *Sitotroga cerealella* eggs. *BioControl* 47: 525-535.
- 43- Rundel B.J., Thomson L.J., and Hoffmann A.A. 2004. Effects of cold storage on field and laboratory performance of *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and the response of three *Trichogramma* spp. (*T. carverae*, *T. nr. Brassicae*, and *T. funiculatum*) to cold. *Journal of Economic Entomology* 97(2): 213-221.
- 44- Saadat D., Bandani A.R., and Dastranj M. 2014a. Comparison of the developmental time of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) reared on five different lepidopteran host species and its relationship with digestive enzymes. *European Journal of Entomology* 111(4): 495-500.
- 45- Saadat D., Seraj A.A., Goldansaz S.H., and Karimzadeh J. 2014b. Environmental and maternal effects on host selection and parasitism success of *Bracon hebetor*. *BioControl* 59:297-306.
- 46- Salt R.W. 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology* 6: 55-74.
- 47- SAS Institute Inc. 2002. SAS System for Windows Version 9.0, Cary, NC, USA.
- 48- Saxena H., Ponnusamy D., and Iquebal M.A. 2012. Seasonal parasitism and biological characteristics of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): a potential larval ectoparasitoid of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in a chickpea ecosystem. *Biocontrol Science and Technology* 22(3): 305-318.
- 49- Tezze A.A., and Botto E.N. 2004. Effect of cold storage on the quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control* 30: 11-16.
- 50- Uwais A., Xu J.J., Yang X.R., He J., Tursun Guo W.C., Xu Y.Q., and Wei Y.Q. 2006. Preliminary test of controlling *Helicoverpa armigera* and *Ostrinia furnacalis* with *Habrobracon hebetor* in fields. *Chinese Journal of Biological Control* 22: 155-157.
- 51- Yazdani M., Haddad Irani Nejad K., and Mashhadi Jafarloo M. 2005. Determining the number of larval instars of the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Phycitidae) in laboratory conditions. *Agricultural Science* 15: 45-54. (In Persian with English abstract)

Cold Storage Possibilities of Pupae and Adults of a Parasitoid Wasp, *Bracon hebetor* Say

A. Afshari^{1*} - E. Hamzhepour Chenari² - A. Iraj³

Received: 11-09-2019

Accepted: 04-03-2020

Introduction: *Bracon hebetor* Say is a well-known cosmopolitan ectoparasitoid that attacks larvae of the various lepidopteran pests, in both grain storage and field conditions. This parasitoid mass-reared on *Anagasta kuehniella* (Zeller) larvae in many insectaries of Iran and released annually into cotton, soybean, tomato and maize fields especially to control *Helicoverpa armigera* (Hübner) in augmentative biological control programs. Cold storage has been considered as an important part in augmentative biological control programs. This technique enables insectaries to store a sufficient number of biocontrol agents for a prolonged period, thus allowing the release of natural enemies concurrent with the critical stages of the pest and minimizing the cost of insect colony maintenance when they are not in demand. In an effort to improve the techniques used in the mass rearing and release of this parasitoid we assessed the storage feasibility of pupa and adult stages of this wasp at a low temperature and the effects of cold storage on its biological and reproductive parameters.

Materials and Methods: *B. hebetor* adults were initially obtained from a commercial insectarium in Gorgan, northern Iran and reared on *Anagasta kuehniella* (Zeller) larvae as factitious host for about five generations. Cold storage experiments were carried out on pupal and adult stages of parasitoid separately. Five hundred 5-days old pupae and five hundred couples of both sexes (female and male) of one-day-old adult parasitoids were collected from the colony and divided into ten groups of 50 parasitoids. Each group (considered as a replication) was released into plastic vials separately, fed adults for 24 hours with a 30% honey solution and then stored in a refrigerator ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, and full darkness) for 7, 14, 21, 30, 45, and 60 days. Vials of non-refrigerated control groups were kept at $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5\%$ RH, and a photoperiod of 16L: 8D h. After each storage period, the pupa eclosion percent and adult mortality percent were subsequently assessed. To evaluate the effect of cold storage on longevity and fecundity of parasitoid, 30 female-male pairs were chosen randomly from the emerging adults (in pupae cold storage experiment) or surviving adults (in adults cold storage experiment), and each pair was placed in a plastic vial separately. Daily, the paired wasps in each container were provided 10 last instars *A. kuehniella* larvae on a piece of paper, as well as several drops of honey solution. The number of eggs laid was recorded on a daily basis until the female parasitoids died. To evaluate the effect of cold storage on parasitoid performance in the next (F_1) generation, 50 newly laid eggs of parasitoid were removed from parasitized host larvae, placed in 10 cm diameter petri dishes individually (one egg/dish) and allowed to develop to adult stage. Developmental time (the period from egg to adult emergence) was recorded for male and female progeny separately and sex ratio (female percentage) of emerging adults was then determined. All experiments were carried out using a completely randomized design (CRD) and data were analyzed using one-way ANOVA and LSD test.

Results and Discussion: Eclosion rate of cold-exposed pupae decreased significantly with increasing cold storage duration. After 7 days of cold storage, about 93 percent of pupae were emerged, whereas all pupae died and no adult wasp was emerged, after 30 days of cold storage. However, cold storage of pupae even for a short duration (e.g. 7 days), had a significant adverse effects on longevity, fecundity and sex ratio of emerged adult parasitoids and means of these parameters were reduced by 55.8, 53.4 and 20%, respectively, compared to unstored control pupae. In adult cold storage experiment, survival rate of both male and female parasitoids was reduced significantly, according to cold duration. Adult mortality percent increased with storage duration and reached 100 and 97.14 % in 60 days storage of male and female parasitoids, respectively. One week storage at 5°C resulted in 4.42 percent mortality in females which was not significantly different from that of the control. Cold storage duration had no adverse effect on the longevity of both male and female parasitoids. Reproductive parameters including mean of daily oviposition (eggs/day/female) and clutch size (eggs/larva) were also not

1, 2 and 3- Associate Professor of Entomology, Former M.Sc. Student of Agricultural Entomology and Former B.Sc. Student of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, respectively.

(* - Corresponding Author Email: Afshari@gau.ac.ir)

significantly affected by cold storage durations. Low temperature storage of parental parasitoids had no significant effect on developmental time (the period from egg to adult emergence) and sex ratio in the F₁ generation. Developmental time of progeny had a little variation among the treatments and changed from 11.9 to 12.77 days in male and 12.07 to 12.8 days in female progeny.

Conclusion: Cold storage of pupae even for a short period, reduced significantly their eclosion rate and longevity and fecundity of adults emerged from these cold-exposed pupae. Cold storage of adult *B. hebetor*, affected negatively their survival, whereas other fitness traits such as longevity, fecundity, developmental time and sex ratio were not significantly reduced after cold storage. In conclusion, *B. hebetor* pupae is not recommended to be stored at low temperature, even for a short period but adult parasitoids can be cold stored for up to 7 days, with negligible mortality (4.41 %). The results of this study can be used in parasitoid mass rearing and cold storing in insectaries.

Keywords: Biological control, *Bracon hebetor*, Cold storage