Archive of SID

تغییرات فیزیولوژیک لاروهای زمستان گذران زنبور مغز خوار بادام، *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytoma) در زرین شهر اصفهان

فاطمه خان محمدی[۱و*]، جهانگیر خواجه‌علی[۱] و حمزه ایزدی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f.khanmohammadi@ag.iut.ac.ir

Physiologic changes in overwintering larvae of the almond wasps, *Eurytoma amygdali* in Zarinshahr, Esfahan, Iran

F. Khanmohammadi[1&*], J. Khajehali [1] and H. Izadi[2]

1. Departman of Plant Protection Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, 2. Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran

*Corresponding author, E-mail: f.khanmohammadi@ag.iut.ac.ir

چکیده

زنبور مغزخوار بادام از آفات مهم بادام است که لاروهای آن تمام تابستان، پاییز، زمستان و قسمتی از بهار را در حالت دیاپوز در داخل میوه‌ها می‌گذرانند. این آفت یک نسل در سال دارد. در این تحقیق تغییرات میزان قندکل، چربی، پروتئین، گلیکوژن، نقطه انجماد بدن و تحمل سرمایی لاروهای زمستان‌گذران از مهر تا اسفند اندازه‌گیری شد. میزان قند کل در ماه‌های مهر و آبان کمترین بود و در سردترین ماه سال (دی) با ۷۶/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن لارو به بالاترین میزان رسید. در دی‌ماه میزان گلیکوژن با ۵۶/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن لارو به پایین‌ترین سطح خود رسید و ٤/٥٤ درصد لاروها تا دمای ۲۵- درجه سلیسیوس را تحمل کردند. این تغییرات بیان‌گر تبدیل گلیکوژن به قندهای الکلی در راستای افزایش تحمل سرمایی است. میزان پروتئین در شروع دیاپوز (مهر) با ٤۲ میلی گرم بر گرم وزن لارو کمترین بود و به‌تدریج افزایش یافت و در بهمن با ٦۸/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن لارو به بالاترین میزان رسید. تغییرات چربی از نظم خاصی پیروی نکرد ولی در اسفند با ۳۹/۰٦ میلی‌گرم بر گرم وزن لارو به بالاترین سطح رسید. نقطه انجماد بدن لاروها در ماه‌های مهر تا بهمن تقریبا یکسان و در حدود ۲۳- درجه سیلیسیوس بود اما در اسفند و با پایان یافتن دیاپوز به کم‌ترین میزان خود، ۱۸/٦۹- درجه سیلیسیوس رسید. تحمل سرمایی لاروها در اسفندماه از سایر ماه‌ها کم‌تر بود به‌طوری که در دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس از مهر تا بهمن ۱۰۰ درصد لاروها زنده ماندند اما در اسفند این میزان به ۷۳/۳۳ درصد رسید.

واژگان کلیدی: دیاپوز، نقطه فوق سرد، سرماسختی، زنبور مغزخوار بادام

Abstract

The almond wasp is the key pest of almonds. The last instar larvae remain in the damaged fruits during summer, fall, winter and even early spring. This is a univoltine pest. In this study, changes in the amount of total carbohydrate, lipid, protein, glycogen, supercooling point and coldhardiness of the diapausing larvae were measured from October to March. Total body sugar in September and October was the lowest and reached the highest level of 69.76 mg/g body weight in the coldest month of the year (January). In January glycogen content with 56.61 mg/g body weight was the lowest and 4.54% of the larvae survived when exposed to -25 ºC. These changes reflect the conversion of glycogen to sugar alcohol in order to increase the insect cold tolerance. The amount of protein in the onset of diapause (October) with 42.00 mg/g body weight was the lowest and gradually rose and reached the highest level of 68.98 mg/g body weight in February. Lipid changes did not follow a specific order, but in March with 39.06 mg/g body weight reached the highest level. Supercooling points of the larvae in September to January were almost the same, at around -23 ºC, but at the end of March with termination of diapause reached to the lowest level of -18.69 ºC. Cold tolerance of the larvae in March was lower than in other months and at -20 ºC from October to February 100% of the larvae survived, but in February this percent reached to 73.33.

Key words: Diapause, Supercooling point, Coldhardiness, Eurytoma amygdali

مقدمه

زنبور مغز خوار بادام، *Eurytoma amygdali* Enderlien (Hymenoptera: Eurytomidae)، یکی از آفات مهم بادام در ایران است و قادر است تا ۹۰٪ محصول را نابود سازد(Talebi Chaichi, 1987). این گونه آفتی تک نسلی است که در برخی از جمعیت‌ها به دلیل دیاپوز طولانی مدت سیکل زندگی خود را در دو یا سه و حتی در مواردی چهار سال تکمیل می کند (Margaritopoulos & Tzanakakis, 2006). این آفت زمستان را به صورت لارو کاملا رشد یافته در داخل بادام آلوده سپری

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کند و در اواخر زمستان شفیره و در بهار افراد بالغ ظاهر شده و پس از جفت‌گیری شروع به تخم‌ریزی داخل بافت مغز بادام قرار می‌کنند. لاروها پس از تفریخ، خود را به جنین بادام رسانده و از آن تغذیه می‌کنند و در اواسط تابستان پس از کامل شدن تغذیه وارد مرحله دیاپوز می‌شوند (Tzanakais & Verman, 1994).

استراتژی‌های زیادی توسط حشرات برای بقا در شرایط نامطلوب محیطی توسعه یافته است. سرماسختی و دیاپوز دو جزء مهم برای بقای حشرات در شرایط آب و هوایی معتدل می‌باشند. دیاپوز یک خواب ژنتیکی وابسته به غدد درون‌ریز است که بسته به گونه حشره در مرحله خاصی از رشد و نمو اتفاق می‌افتد (Denlinger, 1991). سرماسختی و تحمل‌سرمایی به عنوان توانایی گونه برای بقا طولانی یا کوتاه مدت در معرض دمایی پایین شناسایی شده است (Lee 1991). استرتژی تحمل سرما در حشرات به طور کلی به دو دسته تقسیم می‌شود الف) حشرات تحمل کننده یخ که تشکیل یخ خارج سلولی را در بدن تحمل می‌کنند. ب) حشراتی که از اثرات کشنده انجماد با کاهش درجه حرارتی که در آن به صورت خود به خودی انجماد بدن رخ می‌دهد جلوگیری می‌کنند. این مقدار نقطه فوق سرد یا supercooling point نامیده می‌شود که به صورت تجربی با آزاد شدن گرمای نهفته هم جوشی که آب بدن یخ می‌زند مشخص می‌شود (Bausta & Rojas, 1985).

بسیاری از حشرات در زیستگاه‌های معتدل مولکول‌های با وزن مولکولی کم کوچک قند و قندهای الکلی را در طول زمستان انباشته می‌کنند (Ramlov, 2000). ظرفیت تجمع قندهای الکلی ممکن است به صورت فصلی تغییر کند و بسیاری از گونه‌های حشرات در دمای پایین شروع به سنتز این قندها می‌کنند (Nodrin *et al*., 1984). تری‌گلیسیرید فرم ذخیره‌ای لیپید می‌باشد و ذخیره آن، نشانه زمستان‌گذرانی در اغلب حشرات است (Dortland & Esch, 1979). همچنین گلیکوژن به عنوان منبع انرژی مصرف می‌شود اما نقش آن بسیار پیچیده است و می‌تواند به عنوان پیش‌ماده برای مواد محافظت کننده در برابر سرما از قبیل گلیسرول باشد (Storey *et al*., 1981). بسیاری از حشرات زمستان‌گذران قندهای الکلی (مانند گلیسرول، سوربیتول یا اینوزیتول) و یا قندهای ساده (مانند ترهالوز یا گلوکز) را ذخیره می‌کنند در حالی که ذخیره گلیکوژن را می‌شکنند (Storey & Storey, 1991).

در این مطالعه تغییرات فیزیولوژیک منجر به دیاپوز و مقاومت سرمایی زنبور مغزخوار بادام اندازه‌گیری شد. این عوامل ممکن است با سرما سختی و بقا در زمستان در ارتباط باشند. مطالعه فیزیولوژی دیاپوز با هدف ارائه درک بهتر از استراتژی زمستان‌گذرانی این آفت انجام می‌شود.

مواد و روش ها

۱) حشرات

لاروهای زمستان‌گذران (سن آخر) زنبور مغزخوار بادام از باغات آلوده بخش باغ‌بهادران استان اصفهان (۳۲ درجه و ۲۲ دقیقه شمالی و ۵۱ درجه و ۱۳ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۹۰۰ متر از سطح دریا) در ماه‌های مهر تا اسفند سال ۹۳ جمع‌آوری شدند.

۲) آماده‌سازی و هموژنایز حشرات برای آنالیز شیمیایی

۱-۲) اندازه‌گیری قند

برای اندازه گیری قند از روش Warburg & Yuval (1997) استفاده شد. در این روش لارو شسته شده وزن شده و در ۲۰۰ میکرولیتر H2SO4 هموژنایز می‌شود. سپس ۱۳۰۰ میکرولیتر از کلروفوم متانول (۱:۲) به آن افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در

www.SID.ir

Archive of SID

۷۱۵۰ دور سانتریفوژ می‌شود. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت را با ۲۰۰ میکرو لیتر آب مقطر مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سیلیسیوس قرار داده و سپس ۱ میلی لیتر آنترون به آن افزوده و در دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ٦٣٠ نانومتر میزان جذب خوانده شد. استاندارد مورد استفاده در این روش گلوکز بود.

۲-۲) اندازه‌گیری گلیکوژن

برای اندازه‌گیری گلیکوژن از روش Warburg & Yuval (1997) استفاده شد. برای این منظور پلت به دست آمده از سانتریفوژ بالا با ٤٠٠ میکرولیتر متانول ۸۰٪ شست و شو داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سیلیسیوس قرار داده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر را برداشته و با آنترون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سیلیسیوس قرار داده و در دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ٦٣٠ نانومتر میزان جذب خوانده می شود. استاندارد مورد استفاده در این روش گلیکوژن می‌باشد.

۲-۳) اندازه‌گیری چربی

برای اندازه‌گیری چربی از روش Warburg & Yuval (1997) استفاده شد. در این روش ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از اندازه‌گیری قند را درون لوله آزمایش ریخته و صبر کرده تا کاملا خشک شود، سپس ۳۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک اضافه کرده و دما را به مدت ۱۰ دقیقه به ۹۰ درجه سیلیسیوس رسانده، پس از سرد شدن محلول، ۲۷۰۰ میکرولیتر معرف وانیلین اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه نگه‌داری در دمای محیط میزان جذب در دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده می‌شود. در این روش از تریولئین به عنوان استاندارد استفاده می‌شود.

۲-۴) اندازه‌گیری پروتئین کل

جهت اندازه‌گیری پروتئین، ابتدا لاروها به صورت انفرادی وزن شده و سپس درون هاون به همراه ۲-۱/۵میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شوند. برای انداره از روش Bradford (1976) استفاده می‌شود. برای این منظور ۰/۰۵ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل از هموژنایز را با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف که شامل کوماسی بلو، اسید فسفریک و متانول است مخلوط و در طول موج ۵۹۵ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر قرائت می‌شود. در این روش از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده می‌شود.

۳) تعیین نقطه فوق سرد

برای انجام این آزمایش از روش Lee (1991) استفاده شد. انتهای سنسورهای دستگاه ثبت کننده دما (Testo, model 177-T4, Germany) بوسیله چسب نواری روی سطح پشتی بدن لارو ثابت شد و نمونه‌ها درون یک فریزر قابل برنامه‌ریزی برای کاهش تدریجی دما قرار داده شدند. از دمای ۲۰ تا ۳۰- درجه سانتی‌گراد با سرعت ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه دما کاهش یافت. با رسیدن دمای بدن حشره به زیر صفر درجه، کاهش تدریجی دما بوسیله دستگاه دماپای (Testo) ثبت و بوسیله نرم افزار رایانه‌ای (Comsoft 3 software) در فواصل زمانی معین ثبت شد. پایین‌ترین دمایی که در آن دما در اثر آزاد شدن گرمای درونی بدن لارو، افزایش ناگهانی دما مشاهده می‌شود، به عنوان نقطه انجماد بدن لارو ثبت شد.

www.SID.ir

Archive of SID

٤) تعیین بقا در دمای پایین

برای انجام این تست از روش Goto et al.(1998) استفاده شد. بدین ترتیب که تعدادی لارو در دستگاه تست چمبر قرار داده شد و دما از ۲۰+ تا ۲۰- و به نسبت ۰/۵ درجه در دقیقه کاهش یافت و در هرکدام از دماهای ۵-، ۱۰-، ۱۵- و ۲۰- درجه سیلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت نگه‌داری شدند، دوباره دما به ۲۰+ درجه سیلیسیوس و با نسبت قبلی افزایش یافت. پس از ٢٤ ساعت نسبت زنده بودن، با تغییر رنگ بدن یا تکان خوردن لارو ارزیابی شد.

۵) اطلاعات آب و هوایی

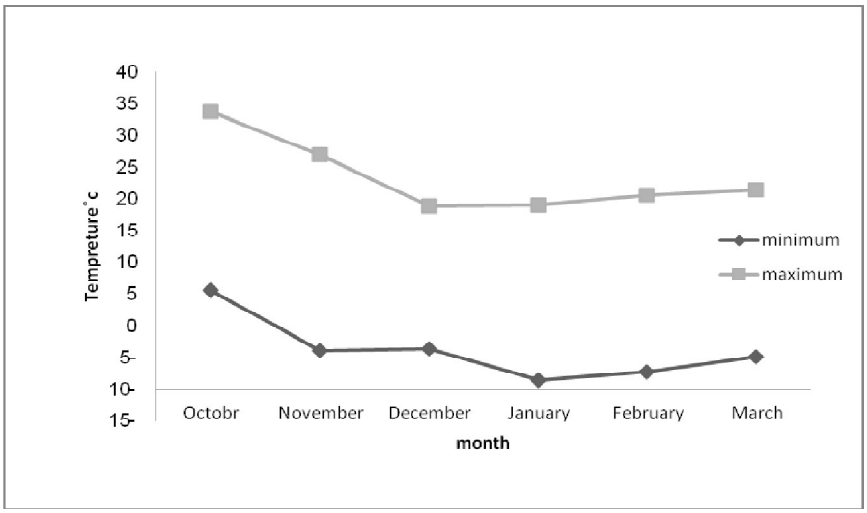
اطلاعات آب و هوایی از سایت هواشناسی ایستگاه زرین شهر که نزدیک‌ترین ایستگاه به محل نمونه‌برداری است دریافت و در شکل یک ارائه شد.

٦) آنالیز داده‌ها

تجزیه داده‌ها به روش مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9 انجام پذیرفت.

نتایج

کمینه دما در اصفهان_ زرین شهر از ٥/٦ در مهر ماه به ٨/٦- در دی ماه کاهش می یابد و پس از آن در اسفند ماه به ٤/٨- افزایش می یابد (شکل ۱).



شکل ۱- کمینه و بیشینه تغییرات فصلی دما در زرین شهر اصفهان از مهر ماه تا اسفند ماه سال ۹۳.

Fig. 1. Seasonal changes in minimum and maximum ambient temperature in Zarin Shahr, Esfahan between October 2014 and March 2015.

www.SID.ir

Archive of SID

۱) مقدار کربوهیدارت

اختلاف در میزان قند و گلیکوژن در طول دیاپوز لارو در جدول شماره یک نشان داده شده است. مقدار قند کل (F۹۲،۵=۳۷/۷۹، P=۰/۰۰۱) از ۲±۳۷/۷٤ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن (در مهر ماه به عنوان گرمترین ماه دیاپوز) افزایش یافته و به بالاترین سطح خود، ٤/۰۳±۷٦/٦۹ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن در دی‌ماه که سردترین ماه سال گزارش شده است می‌رسد. مقدار گلیکوژن (P=۰/۰۱۱۵ ،۳/۲۲= ٦۷ ،F۵) از بالاترین سطح خود ۲/۲۹± ۷۵/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن در مهرماه کاهش یافته و در سردترین ماه سال (دی) به پایین‌ترین سطح ۲/۷۹± ۵٦/۸۱ میلی‌گرم برگرم وزن بدن می‌رسد. کاهش در میزان گلیکوژن با افزایش میزان قند متناسب است و سپس در ماه‌های بهمن و اسفند گلیکوژن افزایش می‌یابد.

۲) میزان چربی

تغییرات میزان چربی (P=۰/۰۰۰۸ ،۵/۸۰، ۲۹=F۵) در بدن لاروهای دارای دیاپوز از نظم خاصی پیروی نکرد و پایین‌ترین سطح آن مربوط به مهرماه با ۰/٦۸ ± ۲۵/٤۵ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن بود و در اسفندماه به ۲/۰٤±۳۹/۰٦ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن رسید. میزان چربی در ماه‌های مهر، دی و اسفند اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۱).

۳) میزان پروتئین

میزان پروتئین (P=۰/۰۰۱۵ ،۵/٤٦، ۲٦=F۵) در طول دیاپوز به‌تدریج افزایش یافت و از ۳/۵۸± ٤۲ در مهرماه به بالاترین سطح خود ۱۰/٤۳ ±٦۸/۹۸ در بهمن ماه رسید (جدول ۱).

٤) بقا در دمایی پایین و نقطه فوق سرد

تغییرات نقطه فوق سرد بدن لاروهای دارای دیاپوز از مهرماه تا بهمن بدون اختلاف معنی‌دار بود ولی در اسفند هم‌زمان با پایان دیاپوز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (جدول ۲). لاروهای دیاپوزی در تمام طول پاییز و ۲ ماه اول زمستان تا دمایی ۲۰- را تحمل کردند و همگی در ۲۵- پس از ۲٤ ساعت مردند ولی تنها در دی‌ماه که سردترین ماه سال است ٤/۵٤٪ از لاروها قادر به تحمل سرمای ۲۵- بودند. در اسفندماه مصادف با افزایش نقطه فوق سرد میزان بقا در ۲۰- از ۱۰۰٪ به ۷۳/۳ ٪ کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۱- مقدار قند کل، گلیکوژن، چربی و پروتئین لارو دیاپوزی زنبور مغزخوار بادام در سال ۱۳۹۳.

Table 1. Chemical content of diapausing larvae of Eurytoma amygdali during 2013-2014.

Month	Chemical content mg/kg body weight (mean± SE)			
	Total sugar	Glycogen	Lipid	Protein
October	37.74±2.00b	75.13±2.29b	25.45±0.68c	42.00±3.58c
November	38.15±1.23b	70.70±5.16ab	27.98±1.18bc	43.16±2.67c
December	70.74±1.92a	69.48±6.07ab	27.18±2.70bc	48.15±2.73bc
January	76.69±4.030a	56.48±2.79a	32.72±2.70b	62.77±5.68ab
February	72.44±3.30a	62.42±4.06a	30.31±2.40bc	68.98±10.43a
March	73.70±2.27a	57.34±2.97a	39.06±2.04a	62.30±2.06ab
F value	F 5,92 =37.97	F5,67 =3.22	F5,29 =5.80	F5,26=5.46
Probability	0.0001	0.0115	0.0008	0.0015

Means within a column followed by the same letter are not significantly different (P> 0.05, Tukey's test).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ارتباط بین نرخ بقا دمایی پایین و نقطه فوق سرد در لارو زنبور مغزخوار بادام.

Table 2. Relationship between low temperature survival rate and supercooling points of diapausing larvae of *Eurytoma amygdale*.

Month	Supercooling point (ºC)	Survival rate (%)			
		-10ºC/24h	-15ºC/24h	-20ºC/24h	-25ºC/24h
October	-22.8±0.56a	100	100	100	0.00
November	-23.78±0.27a	100	100	100	0.00
December	-23.65±0.40a	100	100	100	0.00
January	-23.45±0.34a	100	100	100	4.54
February	-23.08±0.20a	100	100	100	0.00
March	-18.69±1.75b	100	69.23	73.33	0.00

بحث

دیاپوز یکی از عوامل اصلی بقای حشرات شرایط در مناطق معتدل است و حشرات دارای دیاپوز به‌طور معمول دمای پایین‌تری را در مقایسه با حشرات غیردیاپوزی تحمل می‌کنند (Denlinger, 1991). بسیاری از حشرات زمستان‌گذران در طول زمستان سرماسختی خود را افزایش می‌دهند (Lee, 1991).

لاروهای زنبور مغزخوار بادام در طول دیاپوز قند کل خود را افزایش داده و در دی ماه که سردترین ماه سال است به بالاترین سطح خود می‌رسانند. این افزایش متناسب با کاهش میزان گلیکوژن است. این نتایج نشان می‌دهد که تبدیل گلیکوژن به قند در لارو زنبور مغزخوار بادام وابسته به دماست. ذخیره‌سازی قندهای با وزن مولکولی کم و قندهای الکلی نیز در بسیاری از حشرات زمستان‌گذران گزارش شده است (Behrozi *et a*l., 2012; Bemani *et al*., 2012). افزایش در مقدار قند می تواند با کاهش نقطه فوق سرد و افزایش بقا و سرماسختی در ارتباط باشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که افزایش در مقدار قند به احتمال زیاد پاسخی به دماست و به عنوان عامل تحمل دمای پایین عمل می‌کند. ذخیره‌سازی قندهای با وزن مولکولی پایین با کاهش نقطه فوق سرد و افزایش تحمل سرما در ارتباط است (Lee, 1991). گلیکوژن و لیپید دو فرم ذخیره انرژی هستند که با الگوی متفاوتی در طول دیاپوز استفاده می‌شوند (Han & Bauce, 1998). نتایج این تحقیق نظم خاصی در تغییرات لیپید در طول دوران دیاپوز نشان ندادند ولی در اکثر مطالعات سطح لیپید کاهش یافته و این نشان دهنده این است که حشرات در طول دیاپوز توانایی آزاد سازی انرژی از لیپید را دارند (Bemani *et al*., 2012).

حشرات دارای سطح بالایی از آمینو اسید در بافت‌ها و همولنف خود هستند و به‌طور خاص در طول دیاپوز قرار گرفتن در دمایی پایین و شرایط بی‌هوازی سطح پروتیین را افزایش می‌دهد (Goto *et al*., 1998). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در طول دیاپوز سطح پروتیئن افزایش یافته است که این نتیجه با نتایج Sönmez & Gülel (2008) مطابقت دارد.

در طول پاییز و زمستان به‌تدریج کمینه دما کاهش می‌یابد و در دی‌ماه به کم‌ترین حد خود می‌رسد و مطابق با آن نقطه فوق سرد نیز کاهش یافته ولی در آخرین ماه سال که دما رو به افزایش می‌گذارد نقطه فوق سرد افزایش می‌یابد. درمورد بقا در دمای پایین هم دیده می‌شود که با افزایش در نقطه انجماد در اسفند بقا کاهش یافته است. ارتباط بین بقا در دمای پایین و نقطه فوق سرد برای برخی از حشرات مثل *Cydia pomonella* L. (Neven, 1999)، *Phyllonorycter rigoniella* Matsumura (Li *et a*l., 2002) و *Ocneria terebinthina* Strg (Behroozi *et al*., 2012)گزارش شده است. بر اساس نظر Needham *et al*. (1996) مرگ حشرات در دمایی پایین‌تر از نقطه فوق سرد استراتژی عدم تحمل یخ گزارش می‌شود. بنابراین لارو زنبور مغز خوار بادام به عنوان حشره تحمل‌کننده یخ گزارش نمی‌شود زیرا به جز در دی ماه که به طور استثنا ٤/٥٤٪ از لاروها در دمایی ۲۵- زنده می

www.SID.ir

Archive of SID

مانند مابقی لاروها در دمایی پایین‌تر از نقطه فوق سرد مثل ۲۵- زنده نمی‌ماند. در واقع این آفت با کاهش دمایی که در آن دما، آب بدن به طور خود به خود یخ می‌زند زمستان را سپری می‌کند.

منابع

Baust, J. G. & Rojas, R. R. (1985) Insect cold hardiness: facts and fancy. *Journal of Insect Physiol* 31, 755-759.

Behroozi, E., Izadi, H., Samih, M. A. & Moharamipour, S. (2012) Physiological strategy in overwintering larvae of pistachio white leaf borer, Ocneria terebinthina Strg. (Lepidoptera: Lymantriidae) in Rafsanjan, Iran. *Italian Journal of Zoology* 79, 44-49.

Bemani, M., Izadi, H., M, Mahdian., Khani, A. & Samih, M. A. (2012) Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, Arimania comaroffi. *Journal of Insect Physiology* 58, 897-902.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Denlinger, D. L. (1991) Relationship between cold hardiness and diapause. pp. 174–198. in Lee, R. E.& Denlinger, D. L. (Eds) *Insects at Low Temperature.* 511 pp. Chapman & Hall, New York

Dortland, J. F. & Esch,T. H. (1979) A fine structural survey of the development of the adult fat body of Leptinotarsa decemlineata. *Cell Tissue Research* 201, 423-430.

Goto, M., Fujii, M., Suzuki, K. & Sakai, M. (1998) Factors affecting carbohydrate and free amino acid content in overwintering larvae of Enosima leucotaeniella. *Journal of Insect Physiology* 44, 87-94.

Han, E. N. & Bauce, E. (1998) Time of diapause initiation, metabolic changes and overwintering survival of the spruce bud worm Choristonura fumiferana. *Journal of Ecological Entomology* 23, 160-167.

Lee R. E. Jr. (1991) Principles of insect low temperature tolerance. pp. 17-46. in Lee R. E. Jr.& Denlinger D. L, (Eds) *Insects at Low Temperature*. 511 pp. Chapman and Hall.

Li, Y.P., Oguchi, S. & Goto, M. (2002) Physiology of diapause and cold hardiness in overwintering pupae of the apple leaf miner Phyllonorycter ringoniella. *Journal of Physiological Entomology* 27, 92-96.

Margaritopoulos, T. & Tzanakakis, E. (2006) Diapause completion in the almond seed wasp, Eurytoma amygdale (Hymenoptera: Eurytomidae) following early low temperature treatment. *European Journal of Entomology* 103, 733-742.

Needham, G. R., Jaworski, D. C., Chen, C., Lee, R.E. & Chen, C. P. (1996) Cold-hardiness of a laboratory colony of lone star ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33, 706-710.

Neven, L. G. (1999) Cold hardiness adaptations of codling moth, Cydia pomonella. *Cryobiology* 38, 43-50.

Nordin, J. H., Z. Cui & Yin, C. M. (1984) Cold-induced glycerol accumulation by Ostrinia nubilalis larvae is developmentally regulated. *Journal of Insect Physiology* 30, 563-566.

Ramlov, H. (2000) Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Humeral Reproduction* 15, 26-46.

Sönmez, E. & Gülel, V. (2008) Effect of different temperatures on the total carbohydrate, lipid and protein amounts of the bean beetle, Acanthoscelides obtectus say (Coleoptera: Bruchidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 1803-1808.

Storey, K. B., Baust , J. G. & Storey, J. M. (1981) Inter mediary mrtabolism during low temperature acclimation in the over wintering gall fly larva, Eurosta solidaginis. *Comparative Physiology* 144, 183-190.

Storey, K. B. & Storey, J. M. (1991) Biochemistry of cryoprotectants. pp. 64–93. in Lee, R. E.& Denlinger, D. L. (Eds.) *Insects at Low Temperature*. 511 pp. Chapman & Hall, New York.

www.SID.ir

Archive of SID

Talebi Chaichi, P. (1987) *On the bioecology of the almond wasp, Eurytoma amygdali Enderlein (Hym.: Eurytomidae).* 39p. Amidi Press, Tabriz.

Tzanakais, M. E. & Veerman, A. (1994) Effect of temperature on the termination of diapause in the univoltine almond seed wasp Eurytoma amygdali. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 70, 27-39.

Warburg, M. S. & Yuval, B. (1997) Effect of energetic reserves on behavioral patterns of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 112, 314-319.

www.SID.ir