استفاده از سرما به منظور ذخیره جمعیت دوجنسی زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus fabarum* (Braconidae: Aphidiinae)

حسین ماهی[۱]، آرش راسخ[۲]* و پرویز شیشه‌بر[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲*- **نویسنده مسوول:** استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز (arashrasekh@gmail.com)

۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۳

چکیده

" نگهداری در سرما" از معمول‌ترین روش‌های ذخیره‌ی زنبورهای پارازیتوئید در پرورش انبوه این دشمنان طبیعی می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش، امکان سنجی نگهداری مراحل رشدی لارو سن آخر و شفیره‌ی زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus fabarum* در دمای چهار درجه سلسیوس و چگونگی تاثیر دمای ثابت یا نوسان‌دار بر این مراحل رشدی بود. با قرارگیری سه هفته‌ای تیمارهای مختلف در شرایط سرمایی، مشخص شد که تیمار شفیره/ دمای نوسان‌دار، بهترین شرایط برای ذخیره زنبور می‌باشد، چرا که بهترین نرخ ظهور، نسبت جنسی و اندازه، در نتاج ظاهر شده در این تیمار مشاهده شد. در این پژوهش همچنین به منظور تعیین آستانه فعالیت تخم‌گذاری زنبور، ماده‌های جفتگیری کرده در تیمارهای مختلف و به صورت جداگانه به مدت ۲٤ ساعت در دماهای ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ درجه سلسیوس به میزبان دسترسی داشتند. نتایج نشان داد که جمعیت دوجنسی زنبور *L. fabarum* از دمای ۱۰ درجه سلسیوس تخم‌گذاری خود را آغاز کرد، هرچند تمامی نتاج ظاهر شده در این دما نر بودند، اما در نتاج ظاهر شده در تیمار ۱۲ درجه سلسیوس، حشرات ماده نیز مشاهده شد.

کلید واژه‌ها: پارازیتوئید شته، شته سیاه باقلا، سرما نگهداری، دمای نوسان‌دار، حداقل آستانه دمایی تخم‌گذاری

مقدمه

زنبورهای زیرخانواده‌ی Aphidiinae، پارازیتوئیدهایی انفرادی و کوینوبیونت[۱] هستند که منحصراً انگل شته‌ها می‌باشند (سکوئرا و مکوئر[۲]، ۱۹۹۳). در این زیرخانواده، از زنبور *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) به عنوان مهمترین پارازیتوئید شته‌ها در شمال ایران و مرکز اروپا نام برده شده است (راسخ و همکاران[۳]، ۲۰۱۰)، که در کنترل بیش از ۷۰ گونه شته خسارت‌زا روی محصولات کشاورزی و باغی نقش دارد (استاری[۴]، ۱۹۸۶؛ ولکل[۵]، ۱۹۹۲). جمعیت دوجنسی (نرزا[۶]) *L. fabarum* به طور گسترده‌ای در اهواز و از روی گیاهانی از جمله باقلا گزارش شده است (مصدق و همکاران[۷]، ۲۰۱۱).

دما از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که تقریباً روی تمام جنبه‌های زندگی حشره، از تاثیر مستقیم روی فعل و انفعال و عکس‌العمل آنزیم‌ها تا رفتار و شایستگی آنها تاثیر می‌گذارد (لی[۸]، ۱۹۹۱). هر گونه‌ی پارازیتوئید

1 - Koinobiont
2 - Sequeira & Mackauer
3 - Rasekh *et al.*
4 - Stary
5 - Volkl
6 - Arrhenotokous
7 - Mossadegh *et al.*
8 - Lee

دارای یک تاریخچه‌ی تکاملی مختص به خود می‌باشد و بر این اساس اشکال متفاوتی از انطباق با عوامل محیطی، در آنها قابل مشاهده است (جلالی و سینگ[1]، ۱۹۹۲).

نگهداری در سرما می‌تواند ابزار ارزشمندی برای پرورش انبوه حشرات مفید به منظور استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک باشد (لئوپولد[2]، ۱۹۹۸). این روش قبل از رهاسازی انبوه مورد استفاده قرار می‌گیرد (بوردایس و همکاران[3]، ۲۰۱۱). ذخیره‌سازی موفقیت‌آمیز پارازیتوئید در دماهای پایین، روشی ساده برای بیشتر زنده نگه داشتن پارازیتوئیدها و دارای اهمیتی عملی در کنترل بیولوژیک است. در این حالت پارازیتوئیدها راحت‌تر حمل و روانه بازار می‌شوند و هزینه‌های حمل و نقل نیز به دلیل کم اهمیت‌تر شدن عامل زمان، کاهش می‌یابد. علاوه بر این، هماهنگ‌سازی ظهور برای برنامه‌های رهاسازی انبوه (هافسوانگ و هاگوار[4]، ۱۹۷۷)، همگام‌سازی رهاسازی مزرعه‌ای دشمنان طبیعی در زمانی مشخص (به طور مثال طغیان حشرات آفت) (مک دونالد و کوک[5]، ۱۹۹۰؛ لئوپولد، ۱۹۹۸) و در دسترس بودن طولانی مدت آن برای مصرف کنندگان (لئوپولد، ۱۹۹۸) تسهیل می‌شود. استفاده از دمای پایین همچنین به عنوان روشی برای افزایش طول عمر حشرات (کولینت و بوایوین[6]، ۲۰۱۱) و تولید دشمنان طبیعی با شایستگی[7] بیشتر در برنامه‌های کنترل آفات ثابت شده است (مک دونالد و کوک، ۱۹۹۰؛ لئوپولد، ۱۹۹۸). از دامنه‌ی بین صفر تا هفت درجه سلسیوس، بر حسب گونه‌ی زنبور، برای نگهداری طولانی مدت پارازیتوئیدهای شته‌ها استفاده شده است (آرچر و همکاران[8]، ۱۹۷۳؛ اسکوپس و همکاران[9]، ۱۹۷۳؛ سینگ و اسری‌واستاوا[10]، ۱۹۸۸؛ ویتاکر-دیربرگ و همکاران[11]، ۱۹۹۴؛ ریگوکس و همکاران[12]، ۲۰۰۰).

در شرایط نگهداری در سرما، علاوه بر درجه حرارت، مدت زمان قرار گرفتن در معرض سرما نیز از اجزای ضروری بقای حشرات می‌باشد. به طوری که "دوز قرار گرفتن در معرض سرما" به عنوان یک عامل تعیین کننده تعریف شده است (کوستال و همکاران[13]، ۲۰۰۴، کوستال و همکاران، ۲۰۰۶). به طور معمول همراه با افزایش دوز ارائه سرما آسیب‌های سردسازی به طور برگشت ناپذیر بیشتر شده و سرانجام باعث مرگ حشره می‌شود (بیل[14]، ۱۹۹۶؛ کوستال و همکاران، ۲۰۰۶). درد نتیجه در برنامه‌های کنترل بیولوژیک، نگهداری پارازیتوئید در سرما، وقتی مطلوب می‌باشد که رژیم دمایی، مدت زمان و مرحله زیستی مناسب برای ذخیره‌سازی مشخص شده باشد تا زیان‌هایی ازجمله مرگ و میر و کاهش شایستگی بقاء، به حداقل خود برسند (آمیس و همکاران[15]، ۲۰۰۸).

در چندین گونه از حشرات ثابت شده است که با استفاده از رژیم‌های دمایی نوسان‌دار (انتقال به صورت دوره‌های کوتاه مدت به دمای مناسب) به جای دمای پایین ثابت، بقاء به میزان قابل توجهی افزایش یافته (رنالت و همکاران[16]، ۲۰۰۴؛ لی، ۲۰۱۰) و باعث تولید پارازیتوئید شایسته‌تری می‌گردد (اسماعیل و همکاران[17]، ۲۰۱۰). کولینت و همکاران (کولینت و همکاران، ۲۰۰۶) تاکید کرده‌اند که رژیم دمایی نوسان‌دار در مقابل رژیم دمایی ثابت، به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان مرگ و میر در زنبور پارازیتوئید *Aphidius colemani* Viereck شده است. کاهش مرگ و میر به دلیل بازیابی‌های فیزیولوژیک و ترمیم آسیب‌های

1 - Jalali & Singh
2 - Leopold
3 - Bourdais *et al.*
4 - Hofsvang & Hagvar
5 - McDonald & Kok
6 - Colinet & Boivin
7 - Fitness
8 - Archer *et al.*
9 - Scopes *et al.*
10 - Singh & Srivastava
11 - Whitaker-Deerberg *et al.*
12 - Rigaux *et al.*
13 - Kostal *et al.*
14 - Bale
15 - Amice *et al.*
16 - Renault *et al.*
17 - Ismail *et al.*

نگهداری در سرما، با انتقال دوره‌ای به دماهای بالاتر محقق می‌گردد (کولینت و همکاران ۲۰۰۷ الف و ب). در این راستا، با انتقال کوتاه مدت شفیره‌های زنبورهای زیر خانواده‌ی Aphidiinae به دمای مطلوب، کاهش قابل توجهی در آسیب‌های ناشی از نگهداری در سرما مشاهده شده است (کولینت و همکاران، ۲۰۰۶).

نرخ تغییر درجه حرارت نیز می‌تواند بقای حشره را تحت تاثیر قرار دهد. بدیهی است که استفاده از تغییرات دمایی با دامنه‌ی کمتر، فرصتی برای مقاومت به سرما فراهم می‌کند (چوئن و نیکلسون[1]، ۲۰۰۴). چنانچه در زنبور پارازیتوئید *Aphidius rhopalosiphi* (De Stefani-Peres)، مومیایی‌هایی که مستقیماً از دمای اتاق به دمای ذخیره‌سازی منتقل شدند، نرخ بقای کمتری نسبت به تیمارهایی که از دماهای بینابینی استفاده شده بود، نشان دادند (لوی و همکاران[2]، ۲۰۰۵ ب).

بر حسب گونه زنبور می‌توان از مرحله زیستی مشخصی از جمله تخم، لارو و یا شفیره‌ی پارازیتوئید برای نگهداری آن در سرما استفاده کرد (لوی و همکاران، ۲۰۰۵ الف؛ ون بارن و همکاران[3]، ۲۰۰۵). با این حال، شفیره پرکاربردترین مرحله برای سرما نگهداری پارازیتوئیدهای Aphidiid معرفی شده است (آرچر و همکاران، ۱۹۷۴؛ هافسوانگ و هاگوار، ۱۹۹۷). سنین مختلف شفیره‌ی موجود در مومیایی می‌تواند بقا را تحت تاثیر قرار دهد، به طوری که آرچر و همکاران (۱۹۷۳) مشاهده کردند، استفاده از مومیایی جوان‌تر، میزان بقای زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) را افزایش می‌دهد. همچنین مومیایی‌های یک روزه، بهترین مرحله رشدی برای نگهداری زنبور پارازیتوئید *A. rhopalosiphi*، گزارش شده است (لوی و همکاران، ۲۰۰۵ ب).

1 - Chown & Nicolson
2 - Levie *et al.*
3 - van Baaren *et al.*

اندازه بدن و طول دوره رشدی، مولفه‌های کلیدی در استراتژی چرخه‌ی زندگی و چگونگی کسب شایستگی در حشرات پارازیتوئید می‌باشند (سکوئرا و مکوئر، ۱۹۹۲). در پارازیتوئیدها از طول ساق پا به عنوان شاخص مناسبی برای پیشگویی اندازه بدن نام برده شده است (گادفرای[4]، ۱۹۹۴). چنانچه در جمعیت‌های تک جنسی (عامری و همکاران[5]، ۲۰۱۳) و دوجنسی (راسخ، داده‌های منتشر نشده) زنبور *L. fabarum* نیز، طول ساق پا شاخص مرفومتریک مناسبی تشخیص داده شد. بنابراین در این پژوهش، از شاخص طول ساق پا برای پیشگویی اندازه بدن استفاده شد.

هر پارازیتوئید برای آغاز فعالیت تخم‌گذاری خود به دمایی خاص نیاز دارد، به طور مثال، پارازیتوئیدهای *Aphidius ervi* Haliday و *A.rhopalosiphi* به ترتیب در دماهای هشت و ۱۲ درجه سلسیوس شروع به پارازیته کردن شته‌ی *Sitobion avenae* (Fabricius) می‌کنند. اما زنبور *Praon volucre* (Haliday) به دمای بالاتری نیاز دارد (سیسگارد[6]، ۲۰۰۰).

در این پژوهش اثر سرما نگهداری در تیمارهای مختلف روی ویژگی‌های زیستی زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* بررسی شد. همچنین آستانه دمایی آغاز فعالیت تخم‌گذاری زنبورهای ماده تعیین شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری شته و زنبور پارازیتوئید

در این پژوهش، شته سیاه باقلا *Aphis fabae* Scopoli به عنوان میزبان زنبور پارازیتوئید مورد استفاده قرار گرفت. شته‌ها در بهار ۱۳۹۱ از مزارع باقلای اهواز جمع‌آوری و روی رقم شامی گیاه باقلا (*Vicia fabae* L.)، کشت شده در گلدان‌های حاوی خاک اره پرورش یافتند. جمعیت دوجنسی زنبور پارازیتوئید

4 - Godfray
5 - Ameri *et al.*
6 - Sigsgaard

L. fabarum نیز از شته‌های پارازیته در همین مزارع به دست آمد و روی گلدان‌های آلوده به شته سیاه باقلا پرورش یافتند. تمامی حشرات در اتاقک رشد، شرایط دمایی ۱±۲۱ درجه سلسیوس، رطوبت ۵±۵۵٪ و دوره نوری (روشنایی: تاریکی) ۱۶:۸ نگهداری شدند.

برای فراهم کردن شته‌های همسن[1]، تعداد ۱۰۰ شته بالغ از کلنی جدا شد. این شته‌ها به مدت ۱۰ ساعت روی یک شاخه جوان باقلا قرار گرفتند. پس از سپری شدن زمان مورد نظر، شته‌های بالغ از شاخه جدا و فقط پوره‌های جوان باقی ماندند. پوره‌ها تا رسیدن به سن دوم پورگی خود (۶±۵۴ ساعت)، روی شاخه‌ی همواره شاداب باقلا نگهداری شدند.

بر اساس مطالعات قبلی، پوره سن دوم مناسب‌ترین سن برای این زنبور پارازیتوئید بوده و بزرگترین زنبورهای نتاج در این سن رشدی میزبان پرورش یافتند (راسخ، داده‌های منتشر نشده). به منظور تولید زنبورهای همسن، به هر شاخه که حاوی ۲۰۰ عدد پوره سن دوم شته بود، ۳۰ زنبور ماده‌ی جفتگیری کرده (دو روزه و حاصل از پرورش روی شته های همسن سن دوم شته)، معرفی شد. پس از ۱۰ ساعت، زنبورها حذف و شته‌های پارازیته شده تا رسیدن به مرحله رشدی مورد نظر (لارو سن آخر یا شفیره) نگهداری شدند، و سپس در این مرحله رشدی به شرایط سرمایی منتقل شدند.

تاثیر نگهداری در سرما بر ویژگی‌های زیستی زنبورها

از دو مرحله رشدی زنبور که شامل لاروهای سن آخر موجود در شته‌های پارازیته‌ی غیرمتحرک (۶±۱۲۰ساعت پس از زمان پارازیتیسم) و همچنین شفیره‌های موجود در مومیایی‌های یک روزه (۶±۱۴۴ساعت پس از زمان پارازیتیسم)، برای نگهداری در سرما، استفاده شد. این دو مرحله رشدی جهت اجتناب از آسیب‌های ناشی از دستکاری، روی شاخه‌ها باقی ماندند و به همین صورت به شرایط سرمایی (چهار درجه سلسیوس) منتقل شدند. از آن‌جایی که کاهش پلکانی دما قبل از نگهداری در سرما، اثر مثبتی بر بقا دارد (شالابی و راباسه[2]، ۱۹۷۹؛ سینگ و اسری‌واستاوا، ۱۹۸۸)، انتقال پارازیتوئیدها در مرحله لارو سن آخر و شفیره، از اتاق رشد به سرما و همچنین از سرما به اتاق رشد، به طور پلکانی (دو درجه‌ای) با وقفه‌های دو ساعته صورت پذیرفت. تیمارها در سه سطح تعریف شدند که علاوه بر دو مرحله‌ی رشدی به کار رفته، شامل دو رژیم دمایی ثابت و نوسان‌دار (انتقال روزانه به مدت دو ساعت به دمای ۱±۲۱ درجه سلسیوس) و زمان نگهداری در سرما (صفر هفته "شاهد"، و سه هفته) بودند. لازم به ذکر است که تیمارهای شاهد پس از رسیدن به مرحله رشدی مورد نظر، به شرایط سرمایی انتقال نیافتند.

از آن‌جایی که علاوه بر درجه حرارت، طول روز نیز در القای دیاپوز در حشرات نقش دارد (پولگار و هاردی[3]، ۲۰۰۰)، در این پژوهش از طول روز کوتاه (۱۴:۱۰ دوره روشنایی به تاریکی) در طول دوره نگهداری در سرما استفاده شد. تیمارهای شاهد نیز این دوره زمانی مشابه را در شرایط روز کوتاه طی کردند. بنابراین در مجموع در این آزمایش هشت تیمار اعمال شد، که عبارت بودند از: ۱) لارو سن آخر/ دمای ثابت/ صفر هفته (LC0)، ۲)لارو سن آخر/ دمای ثابت/ سه هفته (LC3)، ۳) لارو سن آخر/ دمای نوسان‌دار/ صفر هفته (LF0)، ۴) لارو سن آخر/ دمای نوسان‌دار/ سه هفته (LF3)، ۵) شفیره یک روزه/ دمای ثابت/ صفر هفته (PC0) ۶) شفیره یک روزه/ دمای ثابت/ سه هفته (PC3) ۷) شفیره یک روزه/ دمای نوسان‌دار/ صفر هفته (PF0) ۸) شفیره یک روزه/ دمای نوسان‌دار/ سه هفته (PF3).

تمامی تیمارهای نگهداری شده در سرما، پس از سپری شدن زمان مورد نظر به شرایط اتاق رشد منتقل شدند. در یکایک تیمارها، فاصله زمانی خروج از سرما

1 - Synchronous cohort

2 - Shalaby & Rabasse

3 - Polgar & Hardie

تا ظهور حشرات کامل (با دو بازدید روزانه)، نرخ ظهور، نسبت جنسی (نسبت ماده‌ها به کل حشرات) و طول ساق پای عقب حشرات ماده و نر ظاهر شده، تعیین شد. به منظور تعیین طول ساق پا، زنبورهای ظاهر شده در بخار الکل کشته شدند. سپس توسط دوربین دیجیتال (Nikon Coolpix S10, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) متصل به بینوکولار، از ساق پای عقب آنها عکسبرداری شد و در نهایت به کمک نرم افزار (ImageJ 1.45m (National institutes of Health, USA، طول ساق پای هریک از زنبورها با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

آستانه تخم‌گذاری

برای مشخص شدن پایین‌ترین دمایی که فعالیت تخم‌گذاری زنبور پارازیتوئید در آن دما شروع می‌شود، تعداد ۲۰ عدد ماده‌ی همسن (۶±۲۴ ساعت) جفت‌گیری کرده، به طور جداگانه در دماهای ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ درجه سلسیوس به ۳۰ شته سن دوم مستقر روی یک شاخه شاداب گیاه باقلا (ظروف استوانه‌ای تهویه‌دار به ارتفاع ۱۵ و قطر ۸ سانتی‌متر) معرفی شدند. پس از ۲۴ ساعت زنبورها حذف و شاخه‌های حاوی شته‌های پارازیته، به شرایط اتاق رشد منتقل شدند تا شته‌ها فقط در زمان پارازیتیسم در شرایط سرمایی قرار گرفته باشند. با پرورش شته‌های پارازیته، نرخ ظهور و نسبت جنسی نتاج تعیین شد.

محاسبات آماری

با توجه به وجود سه متغیر، در مواردی که اثرات متقابل بین متغیرها معنی‌دار بود، برای تعیین اختلاف آماری بین تیمارها از آزمون آماری فاکتوریل و برای تعیین اختلاف بین تیمارها از آزمون تکمیلی توکی-کرامر استفاده گردید. در مورد نسبت جنسی و طول ساق پا که اثرات متقابل بین متغیرها معنی‌دار نبود، از آزمون آماری t-test برای تعیین اختلاف بین تیمارهای جفتی استفاده گردید. برای همسان‌سازی نرخ ظهور و نسبت جنسی، از Arcsin داده‌ها و برای مقایسه‌های زنبورهای نر و ماده‌ی درون هر تیمار از آزمون t-test استفاده شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS® Statistics IBM® (Version 20) صورت گرفت و مقایسات آماری در تمامی آزمون‌ها در سطح ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج

اثر نگهداری در سرما بر ویژگی‌های زیستی زنبور پارازیتوئید

نرخ ظهور و نسبت جنسی

نرخ ظهور از جمله پارامترهایی بود که به طور معنی‌داری تحت تاثیر سرما نگهداری قرار گرفت. از میان اثرات متقابل، بین متغیرهای مرحله رشدی و رژیم دمایی (F=۰/۴۲۹, df=۱, P=۰/۵۱۷) و مرحله رشدی و مدت ذخیره‌سازی (F=۱/۳۶۷, df=۱, P=۰/۲۵۱) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما اثر متقابل رژیم دمایی و مدت زمان ذخیره‌سازی معنی‌دار بود (F=۶/۴۴۷, df=۱, P=۰/۰۱۶). اثرات متقابل سه متغیر با هم نیز معنی‌دار نبود ($F_{۷,۳۲}$=۰/۴۲۹; P=۰/۵۱۷). از بین تیمارهای سرما نگهداری شده، تیمار PF3 بیشترین نرخ ظهور را نشان داد (جدول ۱).

مطابق نتایج به دست آمده، نسبت جنسی زنبورهای بالغ ظاهر شده به طور معنی‌داری تحت تاثیر تنش سرمایی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل میان متغیرها معنی‌دار نبود و تنها متغیر مدت نگهداری، بر نسبت جنسی تاثیر گذار بود (F=۲۴/۶۱۳, df=۱, P<۰/۰۰۱). از بین تیمارهای سرما نگهداری شده، تیمار PF3، بالاترین نسبت جنسی را نشان داد (جدول ۲).

مدت زمان بین خروج از سرما تا ظهور حشرات کامل زنبور

در حشرات ماده، نگهداری شدن در سرما، روی طول دوره زمانی (خروج از سرما تا ظهور حشره کامل)، تاثیرات متفاوتی گذاشت. به این صورت که در بررسی اثرات متقابل، متغیرهای مرحله رشدی و رژیم دمایی

(F=۵/۹۳۹, df=۱, P=۰/۰۱۵) و مرحله رشدی و مدت زمان نگهداری (F=۱۵۵/۲۰۳, df=۱, P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌دار دیده شد. اما در اثر متقابل رژیم دمایی و مدت زمان نگهداری (F=۲/۸۴۶, df=۱, P=۰/۰۹۲) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین برهمکنش هر سه متغیر بر هم، معنی‌دار بود ($F_{۷,۵۲۴}$=۵/۹۳۹; P=۰/۰۱۵). از میان همه تیمارهای سرما نگهداری شده، تیمارهای LC3 و LF3، بیشترین زمان را برای ظهور حشرات ماده نیاز داشتند (جدول ۱).

در حشرات نر نیز اثرات متقابل متغیرها معنی‌دار بود، چنانچه اثر متقابل رژیم دمایی و مدت زمان نگهداری (F=۴/۷۱۳, df=۱, P=۰/۰۳۱) و اثر متقابل مرحله رشدی و مدت زمان نگهداری (F=۵۰/۴۳۹, df=۱, P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. اما اثر متقابل مرحله رشدی و رژیم دمایی (F=۰/۱۹۴, df=۱, P=۰/۶۶۰) اختلاف معنی‌داری حاصل نکرد. برهمکنش هر سه متغیر بر هم ($F_{۷,۲۹۰}$=۴/۲۵۴; P<۰/۰۰۱) نیز معنی‌داری بود. از میان تمامی تیمارهای سرما نگهداری شده، تیمار LC3، بیشترین زمان را برای ظهور حشرات نر نیاز داشت (جدول ۱).

هنگامی که این دوره زمانی در زنبورهای نر و ماده ظاهر شده در تمامی تیمارهای سرما نگهداری شده، مقایسه شد، مدت زمان بین خروج از سرما نگهداری تا ظهور حشرات کامل زنبورهای ماده به طور معنی‌داری بیشتر از نرها بود. در حالی‌که در تیمارهای شاهد، بین زنبورهای نر و ماده از نظر مدت زمان ظهور، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

طول ساق پای زنبورهای ظهور یافته

در طول ساق پای حشرات ماده و نر، اثرات متقابل میان متغیرها معنی‌دار نبود. در میان زنبورهای ماده‌ی ظهور یافته از مراحل لاروی و شفیره، بین تیمارهای ذخیره‌سازی شده و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($F_{۷,۲۳۶}$=۷۲/۷۶۷; P<۰/۰۰۱). بر اساس نتایج به دست آمده، از میان تیمارهای نگهداری شده در سرما، بیشترین طول ساق پای حشرات ماده در تیمار PF3 مشاهده شد (جدول ۲). همچنین در مورد زنبورهای بالغ نر نیز، میان تیمارهای ذخیره‌سازی شده و شاهد، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($F_{۷,۲۲۰}$=۴۸/۸۶۲; P<۰/۰۰۱) و تیمارهای PF3 و PC3 بیشترین طول ساق پا را نشان دادند (t=۰/۸۲۵, df=۵۸, P=۰/۴۱۳) (جدول ۲).

هنگامی که اندازه زنبورهای نر و ماده‌ی ظاهر شده در هر یک از تیمارها با هم مقایسه شدند، به جز تیمار LC3، در بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری دیده شد و همواره زنبورهای ماده بزرگتر بودند (جدول ۳).

آستانه تخم‌گذاری

در دماهای ۴، ۶ و ۸ درجه سلسیوس، زنبورها هیچ یک از شته‌های میزبان خود را پارازیته نکردند و از دمای ۱۰ درجه سلسیوس تخم‌گذاری ماده‌ها آغاز شد. در این دما در تمامی تکرارها از تخم‌های گذاشته شده فقط نتاج نر ظاهر شد، اما در زنبورهایی که در دمای ۱۲ درجه سلسیوس میزبان خود را پارازیته کرده بودند، نتاج ماده نیز تولید شد. نرخ ظهور در دمای ۱۲ درجه سلسیوس به طور محسوس بیشتر از دمای ۱۰ درجه سلسیوس بود ولی اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد (t=۱/۷۴۸, df=۳۸, P=۰/۰۸۸). نسبت جنسی در زنبورهای دو تیمار اختلاف معنی‌داری (t=۴/۰۱۹, df=۳۸, P<۰/۰۰۱) را نشان داد (جدول ۴).

بحث

براساس نتایج این پژوهش، رژیم دمایی نوسان‌دار در مقابل رژیم دمایی ثابت، به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان مرگ و میر زنبور پارازیتوئید گردید و تیمار PF3 از میان تیمارهای نگهداری شده در سرما، بیشترین نرخ ظهور را داشت. کولینت و همکاران (۲۰۰۶) نتایج مشابهی را روی زنبور پارازیتوئید *Aphidius colemani* Viereck به دست آوردند. دلیل این کاهش می‌تواند بازیابی فیزیولوژیک و ترمیم آسیب‌های حاصل شده از نگهداری در سرما، با انتقال به دماهای

جدول ۱- نرخ ظهور و مدت زمان (روز) (میانگین ± انحراف معیار) بین خروج از سرما تا ظهور حشرات کامل زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus fabarum* در شرایط مختلف نگهداری در سرما

شاخص	لارو سن آخر				شفیره			
	دمای ثابت		دمای نوسان‌دار		دمای ثابت		دمای نوسان‌دار	
	صفر هفته	سه هفته	صفر هفته	سه هفته	صفر هفته	سه هفته	صفر هفته	سه هفته
	LC0	LC3	LF0	LF3	PC0	PC3	PF0	PF3
نرخ ظهور	۰/۹۲±۰/۰۱	۰/۵۹±۰/۰۶	۰/۹۲±۰/۰۱	۰/۷۰±۰/۰۴	۰/۹۲±۰/۰۲	۰/۶۳±۰/۰۵	۰/۹۲±۰/۰۲	۰/۸۰±۰/۰۲
	Aaα	Aaβ	Aaα	Aaβ	Aaα	Abβ	Aaα	Aaα
تکرار	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
مدت زمان (ماده)	۳/۷۷±۰/۰۴	۴/۹۲±۰/۰۶	۳/۷۷±۰/۰۴	۴/۹۸±۰/۰۶	۳/۷۶±۰/۰۴	۴/۰۲±۰/۰۹	۳/۷۶±۰/۰۴	۳/۶۵±۰/۰۶
	Aaβ	Aaα	Aaβ	Aaα	Aaβ	Baα	Aaα	Bbα
تکرار	۱۰۵	۳۰	۱۰۵	۳۰	۱۰۱	۳۰	۱۰۱	۳۰
مدت زمان (نر)	۳/۷۲±۰/۵۶	۴/۵۴±۰/۰۸	۳/۷۲±۰/۵۶	۴/۲۸±۰/۰۸	۳/۷۰±۰/۶۱	۳/۶۳±۰/۰۶	۳/۷۰±۰/۶۱	۳/۴۰±۰/۱۱
	Aaβ	Aaα	Aaβ	Abα	Aaα	Baα	Aaα	Baβ
تکرار	۴۷	۳۰	۴۷	۳۰	۴۲	۳۰	۴۲	۳۰

A/B مقایسه میان تیمارهایی با مرحله رشدی متفاوت (لارو سن آخر یا شفیره)، a/b مقایسه میان تیمارهایی با رژیم دمایی متفاوت (دمای ثابت یا نوسان‌دار، α/β مقایسه میان تیمارهایی با رژیم دمایی متفاوت (شاهد یا سه هفته). حروف غیر مشابه براساس آزمون توکی کرامر در سطح ۵ ٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

بالاتر باشد (کولینت و همکاران ۲۰۰۷ الف و ب).

همچنین مطابق با نتایج به دست آمده، اثرات مفید دمای نوسان‌دار بر نسبت جنسی نیز نمایان گشته و باعث افزایش این نسبت در تیمارهای با دمای نوسان‌دار گردید. به طوری که در این رژیم دمایی، نسبت جنسی در هر دو مرحله رشدی سرما نگهداری شده به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دمای ثابت بیشتر بود. از آنجا که ماده‌ها اغلب دارای نیازهای تغذیه‌ای حساس‌تری نسبت به نرها می‌باشند (هاروی و همکاران[1]، ۱۹۹۸)، در میزبان‌هایی با کیفیت پایین، مراحل نابالغ ماده‌ها بیشتر در معرض خطر مرگ و میر می‌باشند (واگ[2]، ۱۹۸۶).

نگهداری در سرما نیز به عنوان یک استرس بر میزبان، می‌تواند با تاثیر روی کاهش کیفیت میزبان، بر نسبت جنسی تاثیر گذاشته و آنرا متمایل به نر بکند (ولینگز و همکاران[3]، ۱۹۸۶؛ بایرام و همکاران[4]، ۲۰۰۵).

در تعیین شایستگی نتاج، اندازه‌ی حشره بالغ پارازیتوئید معمولاً به عنوان یک ویژگی مهم مد نظر قرار می‌گیرد چرا که با افزایش اندازه، بر ویژگی‌های شایستگی از جمله باروری و طول عمر افزوده می‌شود (کلوتیر و همکاران[5]، ۱۹۸۱؛ رویتبرگ و همکاران[6]، ۲۰۰۱؛ عامری و همکاران، ۲۰۱۳). اندازه‌ی بدن از جمله ویژگی‌هایی است که به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود. بنابراین عوامل محیطی از جمله دما می‌توانند تاثیرات معنی‌داری بر آن بگذارند (سیبلی و آتکینسون[7]، ۱۹۹۴). در این پژوهش ما به این نتیجه رسیدیم که اندازه‌ی حشرات بالغ زنبور پارازیتوئید *L. fabarum*، نیز تحت تاثیر نگهداری در سرما قرار می‌گیرد. چنانچه با ذخیره‌سازی در سرما، از اندازه حشرات در مقایسه با تیمار شاهد کاسته شد. البته نگهداری در رژیم دمایی نوسان‌دار در مقایسه با رژیم دمایی ثابت، به طور معنی‌داری در جلوگیری از کاهش هرچه بیشتر اندازه‌ی

1- Harvey *et al.*
2 - Waage
3 - Wellings *et al.*
4 - Bayram *et al.*
5 - Cloutier *et al.*
6 - Roitberg *et al.*
7 - Sibly & Atkinson

جدول ۲- نسبت جنسی و طول ساق پای عقب (میانگین ± انحراف معیار) بالغین ظهور یافته‌ی زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus fabarum* در شرایط مختلف نگهداری شده در سرما

شاخص		دمای ثابت			دمای نوسان‌دار		
		صفر هفته (شاهد)	سه هفته		صفر هفته (شاهد)	سه هفته	
نسبت جنسی	لارو سن آخر	۰/۷۹±۰/۰۷ (n =۵)	۰/۵۳±۰/۰۴ (n =۵)	t=۳/۲۸۱ , df=۸ , P=۰/۰۱۱	۰/۷۹±۰/۰۷ (n =۵)	۰/۵۸±۰/۰۷ (n =۵)	t=۲/۰۳ , df=۸ , P=۰/۰۷۷
		LC0-LF0: t=۰/۰ , df=۸ , P=۱/۰۰۰			LC3-LF3: t=۰/۷۲۱ , df=۸ , P=۰/۴۹۱		
	شفیره	۰/۸۲±۰/۰۸ (n =۵)	۰/۴۶±۰/۰۵ (n=۵)	t=۳/۷۷۴ , df=۸ , P=۰/۰۵	۰/۸۲±۰/۰۸ (n=۵)	۰/۷۰±۰/۰۷ (n =۵)	t=۱/۱۸۲ , df=۸ ,P=۰/۲۷۱
		PC0-PF0: t=۰/۰ , df=۸ , P=۱/۰۰۰			PC3-PF3: t=۲/۷۷۸ , df=۸ , P=۰/۰۲۴		
		t=۰/۲۹۳ , df=۸ , P=۰/۷۷۷	t=۱/۰۱۷,df=۸ ,P=۰/۳۳۹		t=۰/۲۹۳ , df=۸ , P=۰/۷۷۷	t=۱/۱۰۷ , df=۸ , P=۰/۳	
طول ساق پای ماده (میلیمتر)	لارو سن آخر	۰/۵۰±۰/۰۱ (n =۳۳)	۰/۳۷±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۱۱/۹۱۱, df=۶۱, P ۰/۰۰۱	۰/۵۰±۰/۰۱ (n=۳۳)	۰/۳۷±۰/۰۳ (n=۳۰)	t=۱۳/۰۲۳ , df=۶۱,P ۰/۰۰۱
		LC0-LF0 t=۰/۰ , df=۶۴ , P=۱/۰۰۰			LC3-LF3: t=۰/۰۵۱ , df=۵۸ , P=۰/۹۵۹		
	شفیره	۰/۴۹±۰/۰۱ (n =۲۹)	۰/۳۹±۰/۰۱ (n =۳۰)	t=۱۰/۷۸ , df=۵۷ , P ۰/۰۰۱	۰/۴۹±۰/۰۱ (n=۲۹)	۰/۴۱±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۸/۴۲۸ , df=۵۷ , P ۰/۰۰۱
		PC0-PF0: t=۰/۰ , df=۵۶ , P=۱/۰۰۰			PC3-PF3: t=۲/۴۰۱ , df=۵۳ , P=۰/۰۲		
		t=۰/۰۱۳ , df=۶۰ , P=۰/۹۸۹	t=۲/۱۴۷ , df=۵۸ , P=۰/۰۳۶		t=۰/۰۱۳ , df=۶۰ , P=۰/۹۸۹	t=۴/۶۴۹ , df=۵۸ , P ۰/۰۰۱	
طول ساق پای نر (میلیمتر)	لارو سن آخر	۰/۴۶±۰/۰۱ (n=۲۹)	۰/۳۶±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۹/۵ , df=۵۷ , P ۰/۰۰۱	۰/۴۶±۰/۰۱ (n=۲۹)	۰/۳۵±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۱۰/۰۲۳, df=۵۷, P ۰/۰۰۱
		LC0-LF0: t=۰/۰, df=۵۶ , P=۱/۰۰۰			LC3-LF3: t=۰/۸۹۳ , df=۵۸ , P=۰/۳۷۶		
	شفیره	۰/۴۷±۰/۰۱ (n=۲۵)	۰/۳۷±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۹/۴۴۷, df=۵۲, P ۰/۰۰۱	۰/۴۷±۰/۰۱ (n=۲۵)	۰/۳۹±۰/۰۱ (n=۳۰)	t=۶/۹۴۱ , df=۵۳ , P ۰/۰۰۱
		PC0-PF0: t=۰/۰ , df=۴۸ , P=۱/۰۰۰			PC3-PF3: t=۰/۸۲۵ , df=۵۸ , P=۰/۴۱۳		
		t=۰/۵۱۹ , df=۵۲ , P=۰/۶۰۶	t=۹/۳, df=۵۸ , P=۰/۳۵۶		t=۰/۵۱۹ , df=۵۲ , P=۰/۶۰۶	t=۴/۲۵۸, df=۵۸ , P ۰/۰۰۱	

جدول ۳- مقایسه طول ساق پا (میانگین±انحراف معیار) و دوره‌ی بعد از نگهداری در سرما (میانگین±انحراف معیار)، در زنبورهای نر و ماده‌ی *Lysiphlebus fabarum* ظاهر شده در هر یک از تیمارها

تیمار	طول ساق پا (میلی متر)					طول دوره بعد از سرما نگهداری (روز)				
	ماده	نر	*P*	df	*t*	ماده	نر	*P*	df	*t*
LC0	۰/۵۰±۰/۰۱ a	۰/۴۶±۰/۰۱ b	۰/۰۲	۶۰	۳/۲۱۳	۳/۷۷±۰/۰۴ a	۳/۷۲±۰/۵۶ a	۰/۳۴۷	۱۴۸	۰/۹۴۴
LC3	۰/۳۷±۰/۰۱ a	۰/۳۶±۰/۰۱ a	۰/۲۷۷	۵۸	۱/۰۹۸	۴/۹۲±۰/۰۶ a	۴/۵۴±۰/۰۸ b	۰/۰۲	۵۸	۳/۲۶۲
LF0	۰/۵۰±۰/۰۱ a	۰/۴۶±۰/۰۱ b	۰/۰۲	۶۰	۳/۲۱۳	۳/۷۷±۰/۰۴ a	۳/۷۲±۰/۵۶ a	۰/۳۴۷	۱۴۸	۰/۹۴۴
LF3	۰/۳۷±۰/۰۱ a	۰/۳۵±۰/۰۱ b	۰/۰۳۹	۵۸	۲/۱۱۱	۴/۹۸±۰/۰۶ a	۴/۲۸±۰/۰۸ b	<۰/۰۰۱	۵۸	۷/۴۹۸
PC0	۰/۴۹±۰/۰۱ a	۰/۴۷±۰/۰۱ b	۰/۰۲۱	۵۲	۲/۳۸۵	۳/۷۶±۰/۰۴ a	۳/۷۰±۰/۶۱ a	۰/۳۵۲	۱۳۹	۰/۹۳۳
PC3	۰/۳۹±۰/۰۱ a	۰/۳۷±۰/۰۱ b	۰/۰۲	۵۸	۳/۲۷۲	۴/۰۲±۰/۰۹ a	۳/۶۳±۰/۰۶ b	<۰/۰۰۱	۵۸	۳/۵۳۹
PF0	۰/۴۹±۰/۰۱ a	۰/۴۷±۰/۰۱ b	۰/۰۲۱	۵۲	۲/۳۸۵	۳/۷۶±۰/۰۴ a	۳/۷ ±۰/۶۱ a	۰/۳۵۲	۱۳۹	۰/۹۳۳
PF3	۰/۴۱±۰/۰۱ a	۰/۳۹±۰/۰۱ b	۰/۰۱۵	۵۸	۲/۲۱۹	۳/۶۵±۰/۰۶ a	۳/۴۰±۰/۱۱ b	<۰/۰۰۱	۵۸	۴۵/۰۲۹

حروف غیر مشابه در هر ردیف براساس آزمون t-test در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول ٤- نرخ ظهور و نسبت جنسی نتاج حاصل از تخم گذاری زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus fabarum* در دماهای ۱۰ و ۱۲ درجه سلسیوس

	۱۰ درجه	تعدادتکرار	تعداد تکرار	۱۲ درجه	تعدادتکرار	*P*	df	t
نرخ ظهور	۰/۲۸±۰/۰۹۱ a	۲۰	۲۰	۰/۴۹±۰/۰۷۷ a	۲۰	۰/۰۸۸	۳۸	۱/۷۴۸
نسبت جنسی	۰ ±۰/۰۰۰ b	۲۰	۲۰	۰/۲۴±۰/۰۵۹ a	۲۰	<۰/۰۰۱	۳۸	۴/۰۱۹

حروف غیر مشابه در هر ردیف براساس آزمون t-test در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

بالغین، موثر بود. اسماعیل و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش داده‌اند که در زنبور پارازیتوئید *A. ervi* اندازه‌ی بالغین نر و ماده‌ی ظهور یافته از شفیره‌هایی که تحت شرایط دمایی صفر درجه سلسیوس و ثابت بودند، به طور معنی‌داری از سایر تیمارها (صفر درجه سلسیوس نوسان‌دار، چهار درجه سلسیوس ثابت، چهار درجه سلسیوس نوسان‌دار و تیمار شاهد) کمتر بود.

مقایسه‌ی حشرات نر و ماده در هر گروه تیماری نشان داد که در تمام تیمارها به جزء تیمار LC3، اندازه دوجنس با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. به نظر می‌رسد اثر استرس‌زایی شرایط تیماری LC3 آنقدر شدید بوده است که زنبورهای هر دو جنس در این تیمار به حداقل اندازه زیستی ــ مرفولوژیکی خود رسیده‌اند و لذا در این تیمار اختلاف معنی‌داری بین اندازه نتاج نر و ماده مشاهده نشد.

مطابق با نتایج به دست آمده، بیشترین دوره زمانی در مواردی دیده شد که از مرحله رشدی لارو سن آخر پارازیتوئید در رژیم دمایی ثابت یا متغیر (LC3 و LF3) استفاده شد. با این حال تیمار PF3، با وجود اختلاف معنی‌دار با این دو تیمار، دوره زمانی قابل پذیرشی را به نمایش گذاشت. افزایش دوره زمانی (مجموع مدت زمان ذخیره‌سازی و مدت زمان بین خروج از سرما تا ظاهر شدن حشره بالغ)، فرصت بیشتری در اختیار تولیدکنندگان عوامل بیولوژیک برای عرضه به بازار مصرف ایجاد می‌نماید. این موضوع در پارازیتوئیدهای دیگری نیز به اثبات رسیده است. به صورتی که زنبورهای بالغ *Trichogramma nerudai* Pintureau and Gerding حاصل از مومیایی‌های سرما نگهداری شده، یک روز دیرتر از شاهد، ظاهر شدند (تز و بوتو[1]، ۲۰۰۴).

1 - Tezze & Botto

هنگامی که مدت زمان بین خروج از سرما تا ظاهر شدن حشره بالغ در زنبورهای نر و مادهی یک تیمار با هم مقایسه شد، زنبورهای ماده به طور معنیداری، دیرتر از نرها ظاهر شدند که این پدیده میتواند حاکی از این باشد که مادهها به مدت زمان بیشتری برای مهیا شدن شرایط ظهور، نیاز دارند و احتمالاً با ایجاد وقفه در ظهور، بر اندازهی خود افزودند.

در این پژوهش، زنبورهای مادهای که در شرایط سرمایی هشت درجه سلسیوس و کمتر از آن به میزبان خود معرفی شده بودند، قادر به پارازیته کردن میزبان خود نبودند. اما در دماهای بالاتر (۱۰ و ۱۲ درجه درجه سلسیوس) توانستند میزبانهای خود را پارازیته کنند، با این تفاوت که در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، در تمامی تیمارها فقط نتاج نر تولید شد اما در دمای ۱۲ درجه سلسیوس، نتاج ماده نیز تولید شد. تعیین جنسیت در زنبورهای پارازیتوئید به صورت مکانیسم هاپلودیپلوییدی کنترل میشود و تخمهای دیپلویید به نتاج ماده و تخمهای هاپلویید به نتاج نر تبدیل میگردند (کینگ[1]، ۱۹۸۷). علت عدم مشاهده نتاج ماده در دمای ۱۰ درجه سلسیوس میتواند به این علت باشد که پارازیتوئیدهای مادر در این دما فقط تخمهای نر گذاشته باشند (کنترل اختیاری). دلیل دیگر میتواند عدم امکان لقاح بین اسپرم و تخمک در این شرایط دمایی باشد (کنترل اجباری). از دیگر دلایل احتمالی این موضوع میتواند تلفات تخمهای ماده در طول مدت زمان نگهداری (۲۴ ساعت) در ۱۰ درجه سلسیوس باشد. پاسخ قطعی به این موضوع نیاز به آزمایشهای تکمیلی دارد.

نتیجهگیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار شفیره/ دمای نوساندار، بهترین تیمار سرما نگهداری شده در دمای چهار درجه سلسیوس بود، چرا که بیشترین نرخ ظهور، نسبت جنسی و اندازهی بالغین نر و ماده در این تیمار مشاهده شد و دوره زمانی ظهور نیز در این تیمار در قیاس با سایر گروهها، در حد قابل قبولی به دست آمد.

سپاسگزاری

به این وسیله از حمایتهای مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر میگردد.

1 - King

منابع

1. Ameri, M., Rasekh, A., Michaud, J.P., and Allahyari, H. 2013. Morphometric indicators for quality assessment in the aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum* (Braconidae: Aphidiinae). European Journal of Entomology, 110: 519-525.

2. Amice, G., Vernon, P., Outreman, Y., Van Alphen, J., and Van Baaren, J. 2008. Variability in responses to thermal stress in parasitoids. Ecological Entomology, 33: 701–708.

3. Archer, T.L., Murray, C.L., Eikenbary, R.D., and Burton, R. L. 1974. Cold storage of *Lysiphlebus testaceipes* adults. Environmental Entomology, 3: 557-558.

4. Archer, T.L., Murray, C.L., Eikenbary, R.D., Starks, K.J., and Morrison, R.D. 1973. Cold Storage of *Lysiphlebus testaceipes* Mummies. Environmental Entomology, 2: 1104-1108.

5. Bale, J.S. 1996. Insect cold hardiness: a matter of life and death. European Journal of Entomology, 93: 369–382.

6. 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.

7. Bourdais, D., Vernon, P., Krespi, L., Le Lannic, J., and Van Baaren, J. 2011. Behavioural consequences of cold exposure on males and females of *Aphidius rhopalosiphi* De Stephani-Perez (Hymenoptera: Braconidae). BioControl, 57: 349–360.

8. Chown, S.L., and Nicolson, S.W. 2004. Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns. Oxford University Press. Oxford. UK.

9. Cloutier, C., McNeil, J.N., and Regnière, J. 1981. Fecundity, longevity and sex ratio of *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae) persisting different stages of its host, *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae). Canadian Entomologist, 113: 193–198.

10. Colinet, H., and Boivin, G. 2011. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. Biological Control, 58: 83–95.

11. Colinet, H., Hance, T., Vernon, P., Bouchereau, A., and Renault, D. 2007a. Does fluctuating thermal regime trigger free amino acid production in the parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae)? Comparative Biochemistry And Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 147: 484–492.

12. Colinet, H., Nguyen, T.T.A., Cloutier, C., Michaud, D., and Hance, T. 2007b. Proteomic profiling of a parasitic wasp exposed to constant and fluctuating cold exposure. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 1177–1188.

13. Colinet, H., Renault, D., Hance, T., and Vernon, P. 2006. The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold-exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. Physiological Entomology, 31: 234–240.

14. Godfray, H.C.J. 1994. Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

15. Harvey, J.A., Vet, L.E.M., Jiang, N., and Gols, R. 1998. Nutritional ecology of the interaction between larvae of the gregarious ectoparasitoid, *Muscidifurax raptorellus* (Hymenoptera: Pteromalidae), and their pupal host, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Physiological Entomology, 23: 113–120.

16. Hofsvang, T., and Hagvar, E.B. 1977. Cold storage tolerance and supercooling points of mummies of *Ephedrus cerasicola* Stàry and *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae). Norwegian Journal of Entomology, 24: 1–6.

17. Ismail, M., Van Baaren, J., Hance, T., Pierre, J.S., and Vernon, P. 2013. Stress intensity and fitness in the parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae): temperature below the development threshold combined with a fluctuating thermal regime is a must. Ecological Entomology, 38: 355–363

18. 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.

19. Jalali, S.K., and Singh, S.P. 1992. Differential response of four *Trichogramma* species to low temperatures for short term storage. Bio Control, 37: 159–165.

20. King, B.H. 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. Quarterly review of Biology, 62: 367–377.

21. Kostal, V., Vambera, J., and Bast, 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, 07: 1509–1521.

22. Kostal, V., Yanagimoto, M., and Bast, J. 2006. Chilling-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 143: 171–179.

23. Lee, R.E. 1991. Principles of insect low temperature tolerance *In*: Lee, R.E., and Denlinger, D.L. (Eds.). Insects at Low Temperature. Chapman and Hall. New York and London, pp: 17-46.

24. Lee, R.E. 2010. A primer on insect cold-tolerance In: Denlinger, D.L., and Lee, R.E. (Eds.), Low temperature biology of insects. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 3–35.

25. Leopold, R.A. 1998. Cold storage of insects for integrated pest management *In:* (Eds) Hallman, G.J., and Denlinger, D.L. Temperature sensitivity in insects and

application in integrated pest management. Westview Press. Boulder, CO, pp: 235–267.

26. Levie, A., Legrand, M.A., Dogot, P., Pels, C., Baret, P.V., and Hance, T. 2005 a. Mass releases of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiinae), and strip management to control of wheat aphids. Agriculture, Ecosystems & Environment, 105: 17–21.

27. Levie, A., Vernon, P., and Hance, T. 2005b. Consequences of acclimation on survival and reproductive capacities of cold-stored mummies of *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiinae). Journal of Economic Entomology, 98: 704–708.

28. McDonald, R.C., and Kok, L.T. 1990. Post refrigeration viability of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) prepupae within host chrysalids. Journal of Entomological Science, 25:409–413.

29. Mossadegh, M.S., Stary, P., and Salehipour, H. 2011. Aphid parasitoids in a dry lowland area of Khuzestan, Iran (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). Asian Journal of Biological Sciences, 4: 175–181.

30. Polgar, L.A., and Hardie, J. 2000. Diapause induction in aphid parasitoids. Entomologia Experimentalis et Applicata, 97: 21–27.

31. Rasekh, A., Michaud, J.P., Kharazi-Pakdel. A., and Allahyari, H. 2010. Ant mimicry by an aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hymenoptera: Aphidiidae). Journal of Insect Science, 10: 126.

32. Renault, D., Nedved, O., Hervant, F., and Vernon, P. 2004. The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. Physiological Entomology, 29: 139–145.

33. Rigaux, M., Vernon, P., and Hance, T. 2000. Relationship between acclimation of Aphidius rhopalosiphi (De Stefani- Peres) in autumn and its cold tolerance (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Journal Mededelingen – Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, 65: 253–263.

34. Roitberg, B.D., Boivin. G., and Vet, L.E.M. 2001. Fitness, parasitoids, and biological control: an opinion. Canadian Entomologist, 133: 429–438.

35. Scopes, N.E.A, Biggerstaff, S.M., Goodall, D.E. 1973 Cold storage of some parasites used for pest control in glasshouse. Plant Pathology, 22: 189–193.

36. Sequeira, R., and Mackauer, M. 1992. Quantitative genetics of body size and development time in the parasitoid wasp *Aphidius ervi* (Hymenoptera, Aphidiidae). Canadian Journal of Zoology, 70: 1102–1108.

37. Sequeira, R., and Mackauer, M. 1993. Seasonal variation in body size and offspring sex ratio in field populations of the parasitoid wasp, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). Oikos, 68: 340–346.

38. Shalaby, F.F., and Rabasse, J.M. 1979. Effect of conservation of the aphid parasite *Aphidius matricariae* Hald. (Hymenoptera: Aphidiidae) on adult longevity, mortality and emergence. Annals of Agriculturae Science, 2: 59–71.

39. Sibly, R.M., and Atkinson, D. 1994. How Rearing Temperature Affects Optimal Adult Size in Ectotherms. Functional Ecology, 8: 486–493.

40. Sigsgaard, L. 2000. The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi*, and *Praon volucre*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 95: 173–184.

41. Singh, R., and Srivastava., M. 1988. Effect of cold storage of mummies of *Aphis craccivora* Koch subjected to different pre-storage temperature on percent emergence of *Trioxys indicus* Subba Rao and Sharma. Insect Science Applicata, 9: 655–657.

42. Stary, P. 1986. Creeping thistle, *Cersium arvense*, as a reservoir of aphid parasitoid (Aphidiidae) in agroecosystem. Acta Entomologica Bohemoslovaca, 97: 339-346.

43. 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.

44. van Baaren, J., Outreman, Y., and Boivin, G. 2005. Effect of low temperature exposure on host oviposition behaviour and patch exploitation strategy in an egg parasitoid. Animal Behaviour, 70:153–163.

45. Volkl, W. 1992. Aphids or their parasitoids: who actually benefits from ant attendance. Journal of Animal Ecology, 61:273–281.

46. Waage, J.K. 1986. Family planning in parasitoids: adaptive patterns of progeny and sex allocation. In: Waage, J., and Greathead, D. (eds): Insect Parasitoids. 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London. Academic, London, pp. 63–95.

47. Wellings, P.W., Morton, R., and Hart, P.J. 1986. Primary sex-ratio and differential progeny survivorship in solitary haplo-diploid parasitoids. Ecological Entomology, 11: 341–348.

48. Whitaker-Deerberg, R.L., Michels, G.J., Wendel, L.E., and Farooqui, M. 1994. The effect of short-term cold storage on emergence of *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) mummies. Southwestern Entomologist, 19: 115–118.