

شناسایی فریمون شب پره کرم گلوگاه انار با استفاده از روش SPME در ایران

^۱ فهیمه ورشوی، ^۲ یاک حیدری علیزاده، ^۳ حسین فرازمند، ^۴ علی اولیائی ترشیزی، ^۵ محمدسیر جانی

- ۱- دانش آموخته دانشگاه علم و فرهنگ، واحد کاشمر
 - ۲- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور
 - ۳- عضو هیات علمی دانشگاه علم و فرهنگ، واحد کاشمر
 - ۴- عضو هیات علمی ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کاشمر

چکیده:

کرم گلوگاه انار، (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep: Pyralidae)) مهمترین آفت باغهای انار در ایران و سایر کشورهای تولید کننده این میوه است. با توجه به سابقه طولانی خسارت کرم گلوگاه انار روی درختان انار در کشور، تحقیقات راهبردی جهت مدیریت پایدار این حشره ضروری می باشد. ایجاد یک مدیریت صحیح آفت، نیاز به اطلاعات کامل در ارتباط با بیولوژی و نوسانات جمعیت آن و نیز عوامل کنترل کننده جمعیت دارد. آزمایشات باگی در ایران مشخص کرده است که استفاده از فرمون جنسی سنتتیک کرم گلوگاه انار (شبه فرمون)، که در خارج از کشور، شاسایی و سنتز شده است در باگات انار ایران، به منظور کنترل آفت، کاربرد ندارد. در این تحقیق ترکیب اصلی این فرمون *Ectomyelois ceratoniae* Zeller از مناطق مختلف استان های خراسان رديابي گردید. روش شناسایی شامل استخراج فرمون بوسیله *SPME* و تزریق ترکیبات جدا شده و به دستگاه *GC/mass* است. در نمونه تزریق شده به دستگاه ترکیب فرمون اصلی در زمان بازداری ۲۴/۵ (Z,E)-9,11,13-tetradecatrienal, (۸/۷۶ (Z,E)-9,11,13-tetradecadienal,) دقيقه فرمون اصلی کرم گلوگاه بدست آمد.

واژه گان کلیدی: شبپره کرم گلوگاه انار، فرومون، استخراج با فاز جامد

* نویسنده مسئول، رایانامه: paper@farazmand.ir

مقدمه

کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* (*Lepidoptera: Pyralidae*) به عنوان آفت کلیدی و یکی از عوامل مهم کاهش کمی و کیفی محصول انار در ایران محسوب می‌گردد. حشره مذکور در کشورهای حوزه مدیترانه به عنوان آفت عمده درختان خرنوب محسوب می‌شود به همین دلیل بنام شب پره خرنوب نیز شهرت دارد. محققین معتقدند این حشره، یک آفت پلی فاژ میوه است و در بیشتر کشورهای حاره نیمه استوایی انتشار وسیعی دارد. میزانهای این حشره در کشورهای حوزه مدیترانه، خرنوب، مرکبات، خرما، انجیر، انبه، گردو، شاه بلوط و بادام است (*Balachowsky, 1972; Gothilf, 1969*).

در ایران کرم گلوگاه اولین بار از روی درختان انار در استان خراسان رضوی (منطقه کاشمر) شناسایی و معرفی شد. مطالعات بعدی نشان داد که مهمترین آفت انار استانهای کشور، کرم گلوگاه انار است (*شاکری, ۱۳۸۲*). در حال حاضر بیش از ۸۰ درصد محصول انار در دو مرحله درختی و انباری مورد حمله حشره مذکور قرار گرفته و خسارت می‌بینید (بهزادی شهر بابکی، *۱۳۶۷*) همچنین فعالیت و خسارت آن از روی پسته و انجیر در ایران گزارش شده است (*شاکری, ۱۳۷۱*).

یکی از این روش‌های با اهمیت که در ردبایی جمعیت و مبارزه آفات استفاده می‌شود کاربرد فرومون‌ها می‌باشد. فرومون‌ها موادی هستند که امکان گوییش بین افراد هم گونه حشرات، برآورده نیازهای آن‌ها برای ادامه زندگی و بقاء نسل را فراهم می‌سازند. یکی از انواع فرومون‌ها که در برنامه‌های *IPM* جایگاه ویژه‌ای دارد فرومون جنسی (*Sex pheromone*) است. فرومون‌های جنسی واسطه رفتارهایی هستند که زوج را به همدیگر می‌رساند و یا به عبارت دیگر احتمال جفت‌گیری موفقیت آمیز را افزایش می‌دهند. این فرومون‌ها در مبارزه با آفات به روش‌های مختلف قابل استفاده هستند (ملکی میلانی، *۱۳۷۰*).

بیشترین موفقیت‌های کسب شده در طول دو دهه اخیر، عبارت از تعیین هویت شیمیایی و سنتز فرومون‌های تعداد زیادی از حشرات است. براساس منابعی که در مورد این زمینه وجود دارند (*Howse et.al., 1998; Arn et.al., 1992; Haynes et.al., 1990*) در سال‌های اخیر ترکیبات جلب کننده بیش از ۶۰۰ گونه از حشرات آفت شناخته شده که برای تخمین انبوهی، رسم دیاگرام تغییرات جمعیت، تعیین زمان دقیق مبارزه و کاهش جمعیت آفات استفاده می‌شوند. برای مثال از تله‌های فرومونی برای تعیین اوج پرواز پروانه چوبخوار (*Kermania pistaciella*) و میوه‌خوار پسته (*Recurvaria pistacicola*) و تعیین درصد آلدگی مزارع پنبه به کرم خاردار (*Earias insulana*) است. مهمترین این ترکیبات فرومون کرم سیب با نام *Codlemone*, کرم هلو *Orfamone*, کرم آلو *Fonemone*, کرم ذرت *Ostramone*, پروانه خوش خوار مو، کرم ساقه خوار برنج، کرم سرخ پنبه، *Heliothis* و ... می‌باشند (زمردی، *۱۳۷۰*). از ترکیبات فرومونی سنتز شده در پیش آگاهی کرم مرکبات *Ectomyelois transitiuella* در باغات بادام و مقایسه با سایر روش‌های پیش آگاهی نیز استفاده شده است (*Cofflet & Vick, 1979*).

از فرومون جنسی طبیعی کرم گلوگاه انار در ردبایی جمعیت آفات و رسم دیاگرام جمعیت آفت در استان یزد استفاده شده است (جعفری ندوشن، *۱۳۸۲*).

زاکانی و همکاران (*1998*) فرمون جنسی را از حشرات بالغ استخراج و پس از خالص سازی ساختمان آنها را شناسایی نمود که این ترکیبات شامل: (11%)₉(Z,11E)-9,11,13-tetradecatrienal (67), (9Z,11E)-9,11,13-tetradecadienyl acetate (16.5%) و (9Z,11E)-9,11,13-tetradecadienyl acetate (5.5%) در غدد فرمون ماده‌ها *Stenoma cecropia* بوسیله *electroantennograms* شناسایی شدند. شاخکهای حشرات نر به دو ترکیب (ترانس, ۱۱)، (سیس, ۹, ۱۳)-تترادکاتری افال (*9Z,11E*-9,11,13-tetradecatrienal) و (ترانس, ۱۱)، (سیس, ۹)-تترادکاتری انیل استات (*9Z,11E*-9,11-tetradecadienyl acetate) پاسخ داد. یک مخلوط از (ترانس, ۱۱)، (سیس, ۹, ۱۳)-تترادکاتری افال (۰.۸۳٪) و (ترانس, ۱۱)، (سیس, ۹)-تترادکاتری انیل استات (۰.۱۷٪) حشرات نر را بطور موثری جلب نمودند. این آلدهیدها یکی از اجزاء مهم فرومون جنسی حشره می‌باشد.

رفتار و فعالیت الکتروفیزیولوژیکی (Z,E)-۷,۹,۱۱-دودکاتری انیل فرمیت ترکیب غالب فرومون جنسی کرم گلوگاه انار بوسیله *Wind-tunnel* بررسی شد و مشخص گردید شکل فرمیت آن دارای اثر بیولوژیکی یکسان با عصاره طبیعی غدد جنسی است و مشخصا از ترکیب آلدهیدی تکی و یا همراه با دوجزء دیگر فرمون جنسی فعالتر می‌باشد (*Todd et al., 1992*). بیکر و همکاران

(1991) سه عدد از اجزاء فرمون جنسی کرم گلوگاه انار را از غدد فرومون جنسی حشرات ماده بوسیله انواع تکنیکهای گوناگون جداسازی و شناسایی کردند و از جمله این تکنیکها کروماتوگرافی گازی دوگانه-الکتروآنتنوجرافی، آنالیز مس کروماتوگرافی-اسپکتروسکپی، میکروآزوونولیسیس، *wind-tunnel bioassays* و مطالعات مزرعه ای هستند. ترکیب (ترانس، ۱۱، سیس، ۱۳، ۹-*tetradecatrienal*) تترادکاتری انال (Z,E)-9,11,13-*tetradecatrienal* (عنوان اجزاء اصلی فرمون جنسی تشخیص داده شد.

جعفری و همکاران (۱۳۸۱) استفاده از تله های حاوی فرمون طبیعی کرم گلوگاه انار را یکی از روشهای مناسب برای مطالعه دینامیسم جمعیت این آفت اعلام کردند. همچنین این تله ها با شکار حشره نر، نسبت جنسی را بر هم زده و با ایجاد اختلال در روند جفت یابی و جفت گیری، موجب کاهش جمعیت و خسارت آفت می گردند.

مطالعات انجام شده در ایران نشان داد که بطور کلی شبیه فرمون های سنتیک تجاری کرم گلوگاه انار از کارایی بالای برخوردار نبوده و در مناطق جغرافیایی مختلف، نتایج متفاوتی دارد و در هیچ منطقه اناار خیز کشور از لحاظ کارایی قابل مقایسه با فرمون های طبیعی نبوده و لذا قابل توصیه نمی باشد (فرازمند، ۱۳۹۰) با توجه به عدم کارایی مناسب فرمون های سنتیک موجود، در صورت نیاز به ردیابی و مطالعه نوسانات جمعیت، پیشنهاد می شود از فرمون جنسی طبیعی کرم گلوگاه انار (تله حاوی حشره ماده زنده) استفاده شود (فرازمند و مشیری، ۱۳۹۱).

مواد و روش ها:

از خداداد ماه از مناطق مختلف انار کاری مناطق مختلف خراسان (خراسان رضوی، خراسان شمالی و خراسان جنوبی)، میوه های آلووه و یا شفیره های آفت جمع آوری و به تهران انتقال داده شد. انارهای آلووه در آزمایشگاه بطور مرتب بازدید و شفیره های تشکیل شده جمع آوری گردید. پس از خروج حشرات کامل، حشرات ماده بوسیله بینوکلر از حشرات نر جدا گردید. تعداد ۵ حشره ماده دو روزه را (که جفتگیری نکرده اند) در داخل لوله آزمایشگاهی قرارداده و با گذاشتن فیبر بر روی آن برای ۱۲ ساعت (۸ ساعت تاریکی اطاق پرورش را شامل می شود)، ترشحات غدد جنسی حشره ماده و نر بوسیله فیبر *SPME* جمع آوری شد. تزریق مواد جذب شده از حشرات ماده به *SPME* به دستگاه *GC/mass* و مقایسه کروماتوگرامهای بدست آمده با منابع انجام گردیده و مولکولهای اختصاصی افراد ماده شناسایی شد.

نتایج و بحث:

طیف بدست آمده از استخراج با فیبر *SPME* از مناطق مختلف خراسان (شکل-۱) نشان میدهد پیک شاخصی در ناحیه ۲۴/۵ دقیقه و ۸/۷۶ دقیقه وجود دارد که مشان دهنده وجود دو ترکیب فرمون کرم گلوگاه می باشد و شکستهای جرمی آن شامل اعداد زیر با شکستهای فرمون اصلی کرم گلوگاه انار یکسان است.

24.5 min (ions): 276.2, 261.2, 232.2, 217.3, 205.3 (base peak), 189.2, 177.2, 133.2, 91.3, 79.0, 55.3

8.76 min(ions): 57, 67 (base peak), 81, 95, 110, 121, 136, 161, 189, 209

اعدادی که زیر آن خط کشیده شده است با اعداد گزارش شده در مقالات بیکر (۳) یکسان است.

MS Data Review Active Chromatogram and Spectrum Plots - 6/26/2013 02:14 E.U

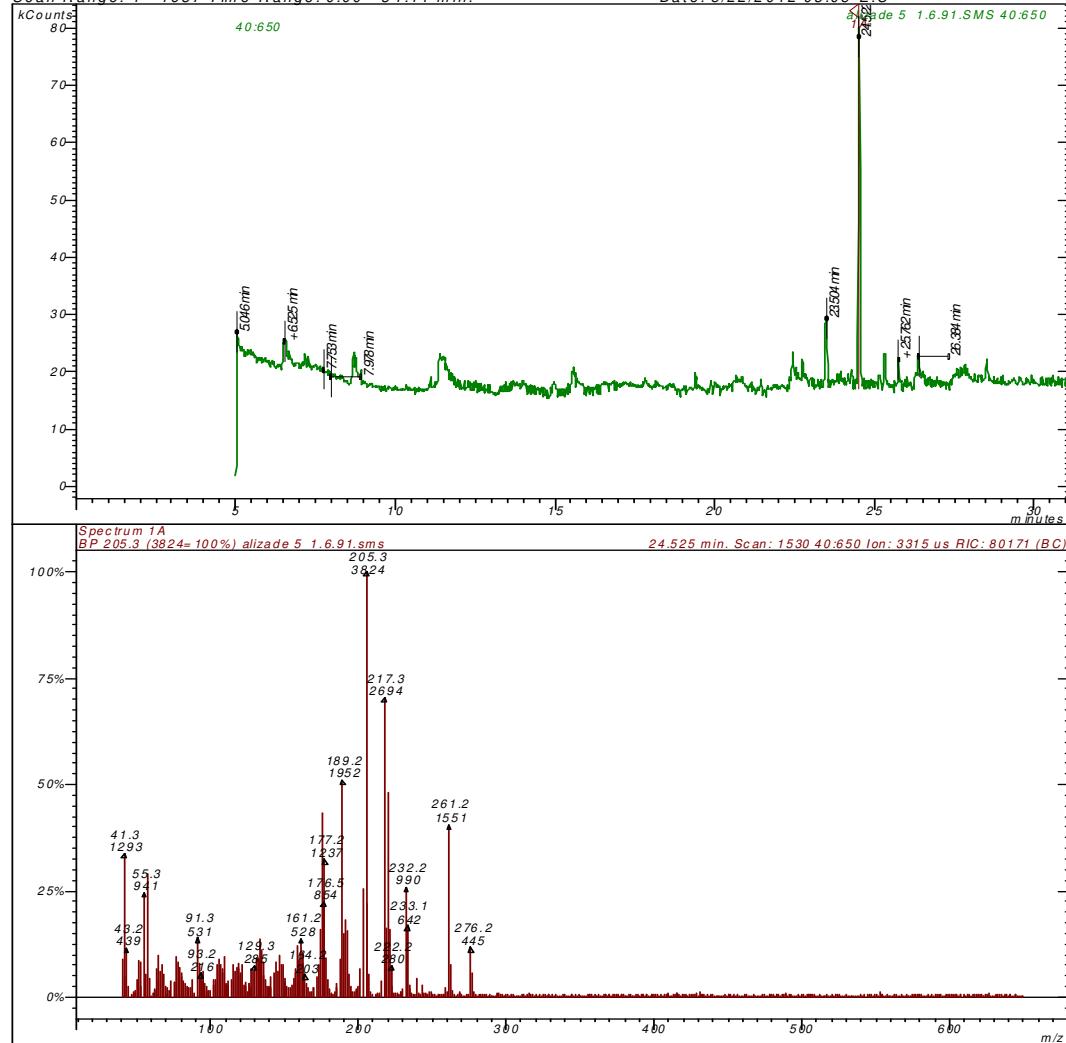
File: ...ification of crab sex pheromone\kerm kharat 91\alizade 5 1.6.91.sms

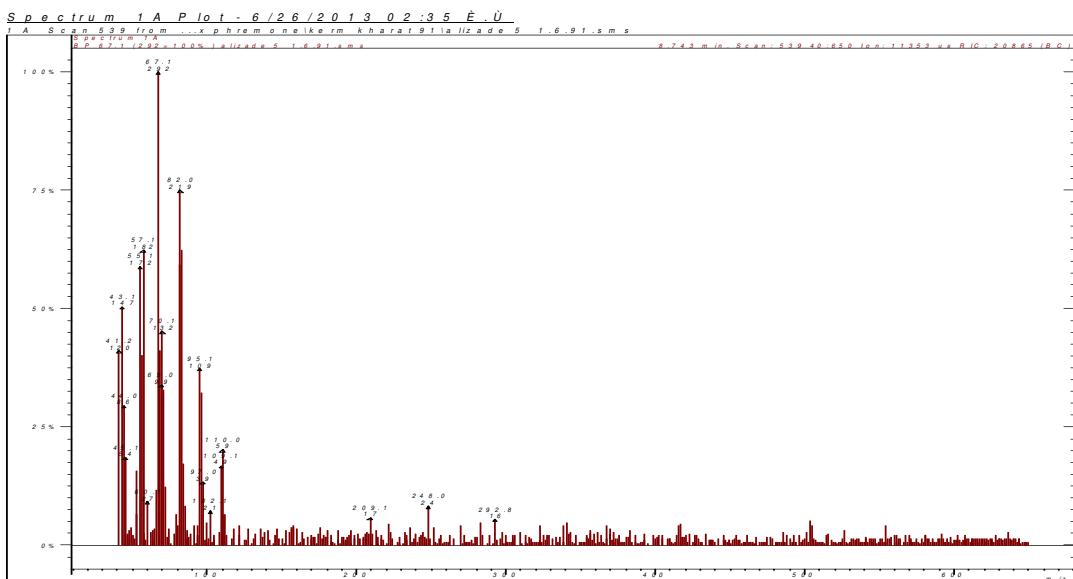
Sample: alizade 5 1.6.91

Operator:

Date: 8/22/2012 03:05 E.U

Scan Range: 1 - 1937 Time Range: 0.00 - 31.11 min.





(شکل ۱: شکست جرمی پیک ۲۴/۵ و ۸/۷۶ دقیقه ترکیبات فرار جذب شده به SPME)

نتیجہ گیری کلی:

ترکیب فرومون جنسی پروانه کرم‌گلوباهانار در سال ۱۹۹۱ شناسایی شد و مشخص گردید که ترکیب اصلی آن $(Z,E)-9,11\text{-tetradecadienal}$ و ترکیبات فرعی آن که در صورت همراه بودن با ترکیب اصلی واکنش رفتاری و پرواز نرها را بهبود می‌بخشد $(Z)-9\text{-tetradecenal}$ و $(Z,E)-9,11\text{-tetradecadienal}$ می‌باشد (Baker et.al., 1991).

روش شناسایی و استخراج فرومون بوسیله *SPME* میتواند روش مناسبی برای شناسایی فرومون‌های جمعیت‌های بومی کشور باشد. بررسی آنالیز طیف‌های بدست آمده ترکیبات فرار حشره ماده دو جزء اصلی ترکیبات فرومون را در زمان بازداری ۲۴/۵ (Z,E)-9,11,13-tetradecatrienal،) و ۸/۷۶ (Z,E)-9,11,13-tetradecadienal،) دقیقه نشان میدهد که شکست پیک‌های این دو طیف تقریباً با شکستهای متتابع گزارش شده یکسان میباشد (Zagatti *et al.*, 1996).

گلدان ساز (۱۳۸۷) در آزمایشی با استفاده از شبه فرومون سنتیک و فرومون طبیعی (ماده های باکره) نتیجه گیری کرد که فرومون طبیعی به طور معنی داری بیشتر از شبه فرومون مصنوعی نهرا را جلب و شکار می نماید. همچنین مقایسه فرومون جنسی طبیعی و شبه فرومون جنسی سنتیک در منطقه یزد نشان داد که در طول مدت ۷۷ روز تله گذاری، میزان شکار تله های حاوی فرومون جنسی طبیعی و جنسی سنتیک به ترتیب ۵۵۳ و ۲۰۱ شب پره نر بود و این نتایج حاکی از کارایی پایین شبه فرومون سنتیک در قیاس با فرومون جنسی طبیعی می باشد (فرازنده، ۱۳۸۹).

لذا مطالعات انجام شده حاکی از پایین بودن کارایی فرومون های سنتتیک موجود و عدم سازگاری آنها با شرایط جغرافیایی کشور بوده و از طرفی کارایی اندک آنها نیز در مناطق مختلف جغرافیایی، متفاوت بوده است. از این رو شناسایی و استخراج جمعیت های فرومون کرم گلوگاه انار در مناطق مختلف میتواند پاسخ عدم جلب حشرات نر یک منطقه جغرافیایی به حشرات ماده مناطق دیگر را مشخص کند. همچنین شناخت بیشتر رفتارهای جنسی حشره بومی کرم گلوگاه انار در مناطق مختلف ایران میتواند رهگشایی در کنترل غیرشیمیایی این آفت مهم کشور باشد. با دستیابی به فرایند روش شناسایی سریع فرومون کرم گلوگاه انار، امکان شناسایی و مقایسه فرومون جمعیت های مختلف این شب پره در کشور فراهم گردید.

منابع:

- ۱- بهزادی شهر باکی، حبیب. ۱۳۶۷. پژوهشی در اینار و تنوع ارقام اینار در ایران. نشر آموزش کشاورزی. ۲۶۶ صفحه.

- ۲- جعفری ندوشن، علی. ۱۳۸۲. بررسی امکان استفاده از فرومون جنسی طبیعی در تعیین اوج پرواز و کاهش خسارت پروانه کرم گلوگاه انار. گزارش نهایی. مرکز تحقیقات کشاورزی بزد. ۴۰ صفحه.
- ۳- جعفری ندوشن، علی. سادات اخوی، سید رضا و عبداللهی، عباس. ۱۳۸۱. بررسی امکان استفاده از فرومون طبیعی در تعیین اوج پرواز کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. جلد اول. دانشگاه رازی. کرمانشاه.
- ۴- زمردی، عظیم. ۱۳۷۰. بهداشت گیاهان زراعی. انتشارات مولف تهران.
- ۵- شاکری منصور. ۱۳۷۱. اولین گزارش از حمله *Specterobates ceratoniae* به انجیر در ایران. نشریه افات و بیماریهای گیاهی. جلد ۶۰. شماره ۱۲. صفحه ۹۳.
- ۶- فرازمند، ح. ۱۳۹۰. مقایسه میزان شکار تله‌های فرومونی جنسی سنتیک کرم گلوگاه انار، گزارش نهایی پژوهه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران. ۳۴ صفحه.
- ۷- فرازمند، ح. و مشیری، ا. ۱۳۹۱. کارائی فرومون سنتیک کرم گلوگاه انار در باغ‌های انار، خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، شیراز، شهریور ۱۳۹۱، صفحه ۸۰-۱.
- ۸- فرازمند، حسین. ۱۳۸۹. مطالعه نوسانات جمعیت کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep.: Pyralidae) و عوامل زنده و غیرزنده کنترل کننده جمعیت آن روی انار و انجیر. گزارش پژوهشی سالیانه. مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، ۱۱ صفحه.
- ۹- گلدان‌ساز، ح. و پور جواد، ن. ۱۳۸۷. بررسی امکان کاربرد فرومون جنسی سنتیک کرم گلوگاه انار در شرایط طبیعی. هجدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران-همدان. صفحه ۲۱۱.
- ۱۰- ملکی میلانی، حسن. ۱۳۷۰. فرومون‌های حشرات. برج، ام سی. و هینس، کی اف. (ترجمه). چاپ اول. انتشارات پیشتاز علم تبریز.

- 1- Arn, H. Toth, M. and Priesner, E. 1992. *List of sex pheromone of lepidoptera and realated attractants*. OILB-SROP. Paris.
- 11-Baker, TC., Francke, W., Millar, JG., Lofstedt, C., Hansson, B., Du, JW., Phelan, PL., Vetter, RS., Youngman, R., Todd, JL. 1991. Identification and bioassay of sex pheromone components of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller); *Journal-of-Chemical-Ecology*. 17: 10, 1973-1988.
- 12-Balachowsky, A. S. 1972. *Entomologie Applique e al Agriculture. Tome II*, Masson et cie paris , 634 pp.
- 13-Cofflet, J. and Vick, K. 1979. Isolation and indefication and synthesis of a female sex pheromone of Navel Orangeworm *Amyelois transitella*. *Journal Chemical Ecology*. 5(6):955-966.
- 14-Gothilf, S. 1969. The biology of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (zell.)in Israel.II.Effect of food,temperature and humidity on development.*Israel J.Ent.*4(1):107-116.
- 2-Haynes, K. F. and Birch, M. C. 1983. The role of other pheromones, allomones and kairomones in the behavioral responses of insects. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (G. A. Kerkut and Gilbert, L. I. eds.). Pergamon Press. Oxford. 9:225-255.
- 3-Hendry, L. B., Pitek, B., Browne, L. E., Wood, D. L., Byers, J. A., Fish, R. H. and Hicks, A. F. 1980. In vivo conveasion of a labeled host-plant chemical to pheromones of the bark beetle *Ips paraconfusus*. *Nature*.284.
- 4-Howse, P. E., Steven, I. D. R. and Jones, O. T. 1998. *Insect Pheromones and their use in Pest management*. Edit Chapman & Hall.
- 15-Todd, JL., Millar, JG., Vetter, RS., Baker, TC. 1992. Behavioral and electrophysiological activity of (Z,E)-7,9,11-dodecatrienyl formate, a mimic of the major sex pheromone component of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, *Journal-of-Chemical-Ecology*. 18: 12, 2331-2352.
- 16-Zagatti, P., Lucas, P., Genty, P., Arango, S., Malosse, C., Tellier, F. 1996. Sex pheromone of *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Elachistidae), *Journal-of-Chemical-Ecology*. 22: 6, 1103-1121.



Detection of pomegranate fruit moth pheromone by SPME method in Iran

Fahimeh Varshovi¹, Babak Heydari-Alizadeh², Hossein Farazmand^{2}, Ali oliae-Torshizi³, Mohammad Sirjani⁴*

1- Graduate of Science and Culture University, Kashmar Branch, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

3- Science and Culture University, Kashmar Branch, Iran

4- Agricultural and Natural Resources Research Station of Kashmar, Iran

ABSTRACT

*Carob moth *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep: Pyralidae) is an important pests of pomegranate trees in Iran and expanding its range into many parts of the world. Because of the long period damages of carob moth on fig and pomegranate, it is essential to accomplish basic research according to a stable control on this pest. A good IPM can be obtained by a complete study on the biology and population diagram. The field test in Iran has shown, using the synthetic characterized pheremone from a broad could not attract male insect. For this reason, in this project try to identify (Z, E)-9, 11-Tetradecadienal and the other components in *Ectomyelois ceratoniae* Zeller in iran population. The method was extraction of pheromone by SPME and identification by GC/mass. Two compounds including (Z, E)-9, 11-Tetradecadienal and (Z,E)-9,11-tetradecadiena characterized from spectra in 24.5 and 8.76 retention time, respectively.*

Key words: pomegranate fruit moth, *Ectomyelois ceratoniae*, pheromone, SPME

* Corresponding author: paper@farazmand.ir