تأثیر باکتری *Wolbachia* بر پاسخ‌های بویایی و قدرت پارازیتیسم زنبور *Trichogramma brassicae* در شرایط آزمایشگاهی

شهرام فرخی، جلال شیرازی و محمدرضا عطاران

مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک

مسئول مکاتبات: شهرام فرخی، shahram.farrokhi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۱ ۷۹-۶۵ (۱) ۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۳۰

چکیده

زنبورهای تریکوگراما به عنوان پارازیتویید تخم و عامل کنترل بیولوژیک بال‌پولک‌داران زیان‌آور در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این زنبورهای هاپلودیپلویید دارای دو شیوه‌ی تولیدمثلی شامل نرزایی و ماده‌زایی می‌باشند که ماده‌زایی آن‌ها اغلب به‌دلیل حضور باکتری *Wolbachia* به‌صورت هم‌زیست درون سلولی است. طی سال‌های اخیر استفاده از زنبورهای ماده‌زا و جمعیت‌های تک‌جنسی به عنوان شیوه‌ای جهت افزایش کارایی کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر این باکتری بر ویژگی‌های رفتاری و قدرت پراکنش و میزان پارازیتیسم زنبورهای ماده‌زا، جمعیت‌های دوجنسی (B) و ماده‌زای (BW^+) زنبور *Trichogramma brassicae* (اکوتیپ بابلسر) در قالب آزمایش‌های بویایی سنجی و همچنین رهاسازی روی بوته‌های ذرت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اتاق حرارت ثابت با یکدیگر مقایسه شدند. نتایجی که با استفاده از بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل بدست آمد، نشان داد که باکتری *Wolbachia* در زنبورهای ماده‌ی اکوتیپ بابلسر که آلودگی آن به‌صورت مختلط می‌باشد، اثر منفی بر قدرت شناسایی و ردیابی رایحه‌ی ناشی از آب و عسل و تخم میزبان واسط و نیز تولید فرمون جنسی آن‌ها تحمیل نمی‌کند. نتایج آزمایش رهاسازی نیز حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری بین تعداد تخم پارازیت شده به‌ازای هر زنبور ماده از جمعیت‌های مورد آزمایش وجود ندارد. اما بر اساس محاسبات، با رهاسازی ۱۰۰ عدد زنبور (شامل زنبورهای نر در جمعیت دوجنسی)، به‌طور میانگین تعداد دسته تخم بیشتری به‌وسیله‌ی جمعیت ماده‌زا (۶/۰۱) در مقایسه با جمعیت دوجنسی (۲/۸۸) پارازیته می‌شود. در مجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که رهاسازی این لاین ماده‌زای زنبور تریکوگراما در شرایط طبیعی می‌تواند از کارایی نسبی بیشتری در برنامه‌های کنترل بیولوژیک برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی: *Trichogramma brassicae*، جمعیت تک‌جنسی، *Wolbachia*، بویایی‌سنج Y شکل، ماده‌زایی، پراکنش، ذرت

مقدمه

زنبورهای تریکوگراما پارازیتویید‌های شناخته شده‌ای هستند که در سطح وسیعی از اکوسیستم‌های زراعی به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک بال‌پولکداران خسارت‌زا رهاسازی می‌شوند (Li, 1994؛ Smith, 1996 و van Lenteren, 2000). سیستم ژنتیکی تعیین جنسیت (sex determination) این حشرات مفید مانند اغلب زنبورهای پارازیتویید هاپلودیپلوییدی (haplodiploidy) است. به‌این صورت که نرها به‌طور معمول هاپلویید و ماده‌ها دیپلویید می‌باشند، اما در مواردی نیز زنبورهای ماده با بکرزایی به شیوه‌ی ماده‌زایی (thelytoky) نتاج ماده‌ی دیپلویید تولید می‌کنند. به‌نظر می‌رسد در این نوع از پارازیتویید‌ها زنبور ماده تمایلی به‌جلب‌کردن جنس نر نداشته باشند. در مقابل، در جمعیت‌های دوجنسی، پارازیتویید‌های نرزا (arrhenotokous) درصورت عدم جفت‌یابی تنها می‌توانند نتاج نر هاپلویید تولید کنند و برای ایجاد زنبورهای ماده،

Archive of SID

www.SID.ir

جفت‌گیری و بارور شدن تخم ضروری می‌باشد. تاکنون ماده‌زایی در ۱۰٪ از گونه‌های شناخته شده‌ی زنبور تریکوگراما گزارش شده (Huigens & Stouthamer, 2003 و Almeida, 2004) که در اغلب آن‌ها این شیوه‌ی تولیدمثل بر اثر آلودگی به‌نوعی باکتری همزیست درون سلولی به‌نام *Wolbachia* القا شده است (Stouthamer *et al.*, 1993). تقریباً در تمام زنبورهای پارازیتویید، افراد نر یک یا چند روز قبل از ماده‌ها ظاهر می‌شوند که این پدیده پروتاندری (protandry) نام دارد (به‌نقل از: Quicke, 1997). در مورد پارازیتویدهای گروهی (gregarious) و یا انفرادی که زنبورهای نر و ماده در نزدیکی یکدیگر از میزبان پارازیت شده خارج می‌شوند، جفت‌گیری در همان منطقه‌ی خروج بسیار محتمل می‌باشد (Pompanon *et al.*, 1997). در چنین شرایطی، جفت‌یابی اغلب از طریق حواس بینایی و لامسه حاصل می‌شود (Tripathi & Singh, 1990). شواهدی دال بر وجود فرمون‌های فرّار (volatile pheromone) و غیرفرّار در تعدادی از پارازیتویدها از جمله زنبورهای خانواده‌ی Trichogrammatidae به‌دست‌آمده است (Pompanon *et al.*, 1997). گرچه اغلب فرمون‌های جنسی که به‌وسیله پارازیتویدها تولید می‌شوند از نوع فرّار می‌باشند، اما به‌نظر می‌رسد در بین گونه‌هایی که جفت‌گیری در همان محل خروج عمومیت بیشتری دارد، استفاده از فرمون‌هایی با برد وسیع و فرّار متداول نباشد (Godfray, 1994). با توجه به‌اینکه تولید فرمون جنسی نیازمند صرف هزینه است، ظاهراً این قابلیت به‌تدریج در زنبورهای ماده‌زای *Eretmocerus mundus* Mercet که فاقد جنس نر می‌باشند، از دست رفته باشد (Ardeh, 2005). مشابه این وضعیت در زنبورهای ماده‌زای *Trichogramma cordubensis* Vargas & Cabello که تمام افراد جمعیت آلوده به باکتری *Wolbachia* هستند، مشاهده شده است. به‌نحوی که زنبورهای ماده به‌طور کلی قادر به‌تولید فرمون جنسی نمی‌باشند و یا مقدار تولید آن در حدی نیست که جنس نر هم‌گونه را تحریک نماید (Silva & Stouthamer, 1997). تحقیقات اخیر نشان داده است که باکتری ولباخیا علاوه بر تأثیر عمده‌ای که بر تولیدمثل میزبان خود دارد، در مواردی نیز می‌تواند بر فعالیت سلول‌های سوماتیک (somatic cells) آن‌ها اثر بگذارد. برای مثال در مورد مگس *Drosophila simulans* Sturtevant این احتمال وجود دارد که باکتری *Wolbachia* از طریق تنظیم بیان ژن‌های وابسته به‌بویایی در میزبان (از جمله ژن *or83b* در مگس‌ها) باعث افزایش سرعت واکنش در آن‌ها شود (Peng & Wang, 2009). در بررسی‌های به‌عمل آمده، تأثیر این باکتری بر میزان باروری و پراکنش جمعیت‌های آلوده مشخص شده است (Stouthamer & Luck, 1993 و Silva, 1999). همچنین در برخی موارد آلودگی مراحل نابالغ زنبور تریکوگراما به باکتری القاکننده بکرزایی parthenogenesis inducing (PI) (PI-*Wolbachia*) اثرات منفی بر قدرت رقابت در شرایط سوپرپارازیتیسم و نرخ بقای آن‌ها به‌جا می‌گذارد (Tagami *et al.*, 2001؛ Hohmann *et al.*, 2001؛ Huigens *et al.*, 2004 و Miura & Tagami, 2004).

اثرات احتمالی *Wolbachia* بر ویژگی‌هایی که از نظر کنترل بیولوژیک حایز اهمیت می‌باشند، مانند قدرت جستجوی میزبان دور از انتظار نمی‌باشد. با این حال، جمعیت‌های تک‌جنسی (unisexual/asexual) یا ماده‌زای تریکوگراما می‌توانند در شرایط محدودیت میزبان به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک برتر محسوب شوند (Stouthamer & Luck, 1993؛ Stouthamer, 1993 و Silva *et al.*, 2000). ازجنبه‌ی نظری، استفاده از پارازیتویدهای ماده‌زا می‌تواند به‌لحاظ نرخ رشد بالا، پایین‌تر بودن هزینه‌ی تولید، استقرار ساده‌تر به‌علت عدم نیاز به‌جفت‌یابی و کارایی در تراکم‌های پایین میزبان، دارای مزیت‌های نسبی باشد (Stouthamer, 1993). تلاش‌های زیادی برای دستیابی به مناسب‌ترین گونه یا اکوتیپ زنبور تریکوگراما صورت گرفته (Hassan, 1988) که این غربال‌گری به‌طور مستمر در مراکز تحقیقاتی انجام می‌شود. میزان موفقیت چنین برنامه‌های تحقیقاتی متغیر بوده و بیشترین توجه بر انتخاب

Archive of SID

www.SID.ir

کاراترین گونه یا اکوتیپ تریکوگراما متمرکز بوده است (Hassan, 1990 و Smith, 1996).

براین اساس، برخی ویژگی‌های بیولوژیک مانند قدرت جستجوگری، میزان باروری، طول عمر و نسبت جنسی برای ارزیابی میزان سودمندی یک پارازیتویید مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌ویژه سرعت جستجو به‌عنوان یک شاخص کیفیت برای زنبورهای *Trichogramma brassicae* Bezdenko تولید انبوه شده، پذیرفته شده است (Bigler, 1989 و Cerutti & Bigler, 1995)، چرا که به‌لحاظ نظری بین میزبان‌یابی و میزان پارازیتیسم در مزرعه رابطه‌ای وجود دارد (پارازیتویید‌هایی که سرعت حرکت زیادتری دارند می‌بایست میزبان‌های بیشتری را پارازیته کنند) (Bigler *et al*., 1988). سرعت قدم‌زدن و جستجوی زنبورهای ماده‌زای *Trichogramma minutum* Riley در مقایسه با هم‌گونه‌های نرزا به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (van Hezewijk *et al*., 2000). همچنین تأثیر *Wolbachia* بر زنبورهای *T. deion* Pinto & Oatman و *T. cordubensis* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شده است. در شرایط آزمایشگاهی، زنبورهای ماده‌ی غیرآلوده که تولیدمثل بکرزایی آن‌ها به‌صورت آرنوتوکی یا نرزایی است از قدرت پراکنش بیشتری برخوردار بودند، در حالیکه زنبورهای لاین ماده‌زا (آلوده به باکتری) در شرایط گلخانه توان بالاتری را برای کنترل بیولوژیک آفت در قیاس با زنبورهای دوجنسی (bisexual/sexual) هم‌گونه از خود نشان دادند (Silva *et al*., 2000). بررسی دیگری که روی گونه‌ی *T. atopovirilia* Oatman & Platner انجام شد نشان داد که آلودگی به‌این باکتری تأثیری بر راه رفتن و دیگر صفات رفتاری زنبور ندارد (Almeida, 2004). همچنین واکنش تابعی جمعیت‌های ایرانی دوجنسی و ماده‌زای *T. brassicae* که در این پژوهش نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند، از نوع II به‌دست آمده و قدرت جستجو یا نرخ حمله (attack rate) آن‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته است (Farrokhi *et al*. 2010). عوامل مختلفی می‌توانند ویژگی‌های زیستی زنبورهای پارازیتویید را تحت تأثیر قرار دهند که از آن جمله می‌توان به‌عوامل زنده و غیرزنده‌ای مانند درجه حرارت، نوع حشره یا گیاه میزبان اشاره کرد (Fathipour *et al*., 2000؛ Wang & Ferro, 1998؛ Reay-Jones *et al*., 2006؛ Kalyebi *et al*., 2005 و Moezipour *et al*., 2008). همچنین تفاوت در نرخ حمله و زمان دستیابی در بین گونه‌ها یا جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی یا مرفولوژیک باشد.

در این پژوهش تأثیر باکتری *Wolbachia* بر قدرت بویایی، روابط شیمیایی، قدرت پارازیتیسم و پراکنش یک جمعیت تک‌جنسی آلوده به باکتری زنبور *T. brassicae* که گونه‌ی غالب زنبور تریکوگراما در کشور بوده و برای کنترل برخی آفات کلیدی مانند ساقه خوار برنج و ساقه‌خوار ذرت رهاسازی می‌شود (Ebrahimi *et al*., 1998؛ Attaran & Dadpour Moghanloo, 2011)، در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌های پژوهش

جمع‌آوری و شناسایی اکوتیپ‌های زنبور تریکوگراما

به‌منظور دستیابی به‌نمونه‌های ماده‌زای آلوده به باکتری ولباخیا طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۴ دسته تخم‌های پارازیته *Ostrinia nubilalis* (Hübner) روی گیاه تاج‌خروس (مستک) *Xanthium strumarium* L. (Asterales: Asteraceae) از مناطق مرکزی و شمال‌غرب استان مازندران جمع‌آوری شد. زنبورهای تریکوگرامای خارج شده در لوله‌هایی جداگانه روی تخم میزبان واسط و در شرایط اتاق حرارت ثابت پرورش داده شدند. سپس گونه‌ی زنبور بر اساس شکل ژنیتالیای نر (Ebrahimi *et al*., 1998) و اندازه و توالی ناحیه‌ی ITS2 (Stouthamer *et al*., 1999 و Gonçalves *et al*., 2006) به‌ترتیب در مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخینگن هلند شناسایی شد. علاوه بر اسلاید میکروسکوپی، لاین‌هایی از جمعیت‌های مورد نظر نیز در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه به‌صورت زنده نگهداری می‌شوند. نمونه‌هایی که نسبت جنسی آن‌ها متمایل به‌جنس ماده بودند با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *wsp*

Archive of SID

www.SID.ir

(*Wolbachia* specific protein) (آغازگرهای 81F و 691R، Braig *et al.*, 1998) از نظر وجود PI-*Wolbachia* مورد بررسی قرار گرفتند.

دو جمعیت دوجنسی غیرآلوده و تک‌جنسی آلوده به *Wolbachia* که از یک زنبور ماده باکره به‌روش تک‌ماده (Isofemale) به‌دست آمده بودند، روی تخم‌های بید غلات *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lep., Gelechiidae) در لوله‌های شیشه‌ای (۲۰۰×۳۵ میلی‌متر) و در شرایط ۱±۲۰ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۵±۶۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی مستقر شدند. با توجه به اثرات منفی و ناشناخته‌ی آنتی‌بیوتیک بر میکروارگانیزم‌های وابسته به‌حشرات، برای تعیین اثرات احتمالی باکتری بر ویژگی‌های رفتاری و قدرت پراکنش و پارازیتیسم زنبور تریکوگراما از دو جمعیت دوجنسی طبیعی (B) و ماده‌زای آلوده به‌باکتری (BW^+) که پیش از این تشابه ژنتیکی آن‌ها تعیین شده(Farrokhi, 2010) و محل جمع‌آوری آن‌ها نیز یکسان بود، در شرایط اتاق حرارت ثابت استفاده شد. زنبورها در زمان انجام آزمایش حداکثر تا ۱۵ نسل در شرایط مذکور پرورش داده شده بودند.

واکنش‌های بویایی سنجی

به‌منظور ارزیابی پاسخ زنبورهای ماده‌ی جمعیت‌های دوجنسی و آلوده به ولباخیا، به‌منبع غذایی و میزبان و همچنین تعیین توانایی آن‌ها در تولید فرمون جنسی از روش بویایی سنجی با بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل (Y-tube olfactometer) در اتاق حرارت ثابت (۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۵±۶۰ درصد و روشنایی دایم) استفاده شد. قسمت اصلی دستگاه مزبور متشکل از یک لوله‌ی شیشه‌ای پیرکس دو شاخه به‌قطر ۲/۵ سانتی‌متر، طول بازوی اصلی آن ۱۵ سانتی‌متر، بازوهای فرعی آن هر کدام ۲۰ سانتی‌متر و زاویه‌ی بین آن‌ها ۷۵ درجه بود. یکی از بازوهای فرعی به‌منبع رایحه (compounds odor/volatile) و دیگری به‌استوانه‌ی خالی به‌عنوان هوای پاک و فاقد مواد محرک (تیمار شاهد) متصل شدند. جریان هوای مداوم ایجاد شده به‌وسیله‌ی پمپ هوا، قبل از ورود به‌استوانه‌های خالی و حاوی منبع رایحه با عبور از استوانه‌هایی که از ذغال فعال شده (activated charcoal) انباشته شده بودند تصفیه می‌شد. قطر و ارتفاع استوانه‌های استفاده شده در این آزمایش‌ها ۳۲ × ۶/۵ سانتی‌متر بود که تنها در مورد آزمون بررسی پاسخ زنبور نر به فرمون جنسی ماده به‌دلیل کوچک بودن جثه و متحرک بودن زنبورها از لوله‌های پلاستیکی به ابعاد ۶۰ × ۱۲ میلی‌متر که دو طرف آن‌ها با توری ارگانزا محصور شده بود استفاده شد. اتصال بین پمپ، استوانه‌ها و لوله‌ی Y شکل با استفاده از شیلنگ‌های سیلیکونی مخصوص انجام شد. میزان جریان هوا توسط یک دبی‌سنج (air flow meter) که در بازوی اصلی قرار داده شده بود، در حد ۱/۵ لیتر در دقیقه تنظیم شد. طراحی و ساخت این بویایی سنج با اندک تغییراتی بر مبنای مدل Takabayashi & Dicke (1992) صورت گرفت.

برای انجام دو آزمایش جداگانه جهت بررسی اثر مستقیم رایحه‌ی تخم میزبان واسط (بید غلات) و عسل روی پاسخ زنبور، ۱۵ دقیقه پیش از آزمایش قطعاتی از کاغذ حاوی ۳-۲ گرم تخم (به‌همراه مقداری پولک بید غلات) یا تکه پنبه‌ی آغشته به آب و عسل ۲۰٪ داخل سیلندر منبع رایحه قرار داده شد. آزمایش بویایی سنجی با آزاد کردن یک عدد زنبور ماده‌ی باکره با سن کمتر از ۲۴ ساعت در بازوی اصلی آغاز شد و تا انتخاب یکی از بازوهای بویایی سنج در محدوده زمانی تعیین شده، ردیابی حشره ادامه یافت. پاسخ زنبور تنها در صورتی مورد قبول واقع می‌گردید که حشره در مدتی کمتر از ۵ دقیقه، دست‌کم ۷ سانتی‌متر از بازوی فرعی را می‌پیمود (Moayeri *et al.*, 2008). زنبورهایی که در این فاصله‌ی زمانی هیچ یک از بازوها (تیمارهای رایحه و هوای پاک) را انتخاب نمی‌کردند، به‌عنوان بی‌پاسخ (no response/no choice) محسوب شده و در محاسبات منظور نمی‌شدند. پس از ارزیابی پاسخ رفتاری هر ۱۰ حشره، لوله‌ی Y شکل با لوله‌ی مشابه و تمیز دیگری جابجا و محفظه‌های مربوط منبع مولد رایحه و هوای پاک بین بازوهای چپ و راست تعویض می‌شدند تا در حد ممکن از بروز هرگونه خطای ناشی از عدم تقارن احتمالی کاسته شود. آزمایش مربوط به پاسخ بویایی زنبورهای ماده جمعیت‌های B و BW^+ به‌رایحه‌ی تخم بید غلات و عسل،

Archive of SID

www.SID.ir

هر کدام در چهار مرحله و هر مرحله با ۳۰ عدد زنبور ماده‌ی تغذیه نشده و منابع جدید مولد رایحه تکرار شد (در مجموع ۱۲۰ زنبور ماده از هر جمعیت). برای آزمایش پاسخ بویایی زنبور نر جمعیت B به ماده‌های غیرآلوده و آلوده به باکتری (B و BW^+) در هر تکرار سه عدد زنبور ماده‌ی باکره از هر یک از دو جمعیت مورد نظر، در لوله‌ی کوچک پلاستیکی محصور شده با توری ارگانزا قرار داده شد. به‌دلیل نتایج قطعی که در حین انجام این سری از آزمایش‌ها به‌دست‌آمد از تعداد تکرار کمتری استفاده شد (دو مرحله و هر مرحله با ۲۰ تکرار).

برای تعیین عدم تجانس در بین تکرارهای هر یک از آزمایش‌ها از روش تکرار نکویی برازش (replicated goodness of fit) استفاده شد (Sokal & Rohlf, 1995) و داده‌های حاصله با مربع کای (Chi-square) مورد آزمون قرار گرفتند. گرایش یکسان زنبورها به‌هر یک از دو بازوی بویایی‌سنج به‌عنوان فرض صفر در نظر گرفته شد.

تعیین میزان پارازیتیسم و جابه‌جایی زنبورها در اتاق حرارت ثابت

برای تهیه‌ی بوته‌های سالم و هم‌سن گیاه میزبان، بذرهای ذرت (KSC 250) به‌صورت جداگانه در گلدان‌هایی به قطر ۲۲ و عمق ۲۵ سانتی‌متر در شرایط گلخانه (۷±۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۵۵ درصد) در خاک زراعی مناسب کشت و نگهداری شدند. پس از ۷-۶ برگی شدن بوته‌ها، گلدان‌ها به اتاق حرارت ثابت (۳×۵×۵ متر) با شرایط محیطی ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در هر تکرار ۱۸ گلدان به‌صورت حرف m روی سکوهایی به ابعاد ۳×۲ متر قرار داده شدند (در مجموع ۳۶ گلدان به‌طور هم‌زمان روی دو سکو). در هر واحد آزمایشی، ۱۴ گلدان در دو طرف محل رهاسازی روی دو بازوی چپ و راست (L ، R) به‌فاصله‌ی ۳۰ سانتی‌متر از هم قرار داده شدند به‌نحوی که با اتصال برگ‌ها انتقال زنبورها به‌بوته‌ی مجاور از طریق راه رفتن نیز امکان پذیر باشد. اما در شاخه‌ی میانی m ، سه بوته (M) با فاصله ۴۵ سانتی‌متر از یکدیگر چیده شدند، که زنبورها به‌دلیل متصل نبودن برگ‌ها به‌یکدیگر تنها با پرواز کردن قادر به جابجایی از بوته‌ای به‌بوته‌ی دیگر بودند. محل رهاسازی، گلدان مشترک بین سه شاخه‌ی m در نظر گرفته شد (شکل ۵). در هر تیمار به‌غیر از بوته‌ی میانی که برای رهاسازی زنبور در نظر گرفته شده بود، در ارتفاع میانی هر یک از بوته‌ها سه عدد نوار کاغذی سبز رنگ (۱۰×۱ سانتی‌متر) هر یک شامل دو دسته‌ی ۱۵۰ عددی تخم بید غلات به‌صورت تصادفی قرار داده شد به‌نحوی که دسته‌های تخم در دو سطح رویی و زیرین برگ قرار می‌گرفتند. برای ایجاد یکنواختی و کاهش تلفات احتمالی زنبورها در خاک مرطوب پای بوته‌ها، سطح تمام گلدان‌ها با صفحات مقوایی به ابعاد ۳۰×۳۰ سانتی‌متر که در مرکز آن‌ها سوراخی به قطر ۲ سانتی‌متر برای خروج ساقه گیاه تعبیه شده بود، پوشانده شد. رهاسازی دو جمعیت B و BW^+ در ۵ تکرار و در هر تکرار به‌طور هم‌زمان در یک اتاق که با توری به دو بخش تقسیم شده بود، انجام شد. بر مبنای درصد خروج و نسبت جنسی زنبورهای ماده‌زا و دوجنسی، تا حد ممکن تعداد زنبور ماده‌ی رهاسازی شده (حدود ۵۰۰ عدد) برای هر دو تیمار مشابه یکدیگر در نظر گرفته شد. همچنین برای به حداقل رساندن خطای آزمایشی، محل رهاسازی جمعیت‌های مورد نظر پس از هر تکرار در دو بخش تفکیک شده‌ی اتاق جابجا می‌شد. تله تخم‌های کاغذی ۵ روز پس از رهاسازی زنبورها، جمع‌آوری و به تفکیک هر بوته و تیمار تا سیاه شدن تخم‌های پارازیته در لوله‌های آزمایش و در شرایط محیطی مناسب نگهداری شدند. در نهایت پس از شمارش و ثبت نتایج و تعیین یکنواختی واریانس نمونه‌ها، از آزمون t (t-test) در نرم‌افزار MSTATC برای مقایسه‌ی آماری میزان پارازیتیسم هر یک از جمعیت‌ها استفاده شد (α =۰/۰۵). ابتدا داده‌ها به روش جذری ($\sqrt{\chi + 0.5}$) تبدیل و سپس تجزیه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

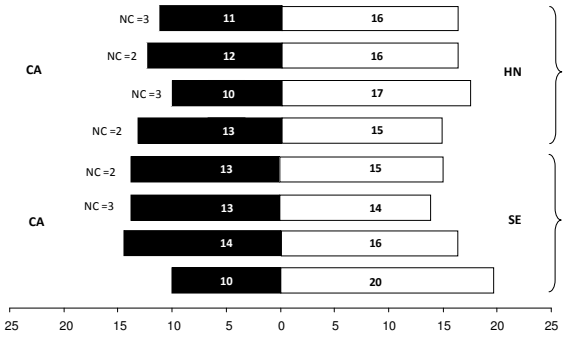
نتایج

شناسایی جمعیت‌های زنبور تریکوگراما

در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از زنبور تریکوگراما، آلودگی به PI-*Wolbachia* به‌ترتیب در بین ۲/۵، ۳/۶ و ۴۹/۵ درصد از افراد جمعیت‌های نور، چمستان و بابلسر برآورد شد. برای انجام آزمایش‌ها یک لاین ماده‌زای خالص شده از جمعیت بابلسر به‌همراه جمعیت دوجنسی که از همان ناحیه از روی گیاه مستک و دسته‌های تخم ساقه‌خوار اروپایی ذرت جمع‌آوری شده بود، به‌ترتیب با اسامی BW^+ و B در نظر گرفته شد که هر دو جمعیت متعلق به‌گونه‌ی *T. brassicae* بودند. مشخصات مربوط به توالی ژن *wsp* باکتری ولباخیا و ناحیه‌ی ITS2 جمعیت زنبور ماده‌زای BW^+ به‌ترتیب با اسامی $wBa_{T.bra}$ و Tbra-B11 و کدهای FJ441291 و FJ441292 در بانک ژن جهانی به‌ثبت رسیده‌اند (Farrokhi *et al.*, 2010).

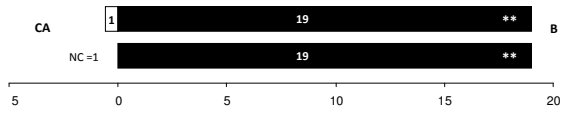
بویایی سنجی

با توجه به متجانس بودن تکرارها در تمام آزمایش‌ها (به‌ترتیب آزمایش: G_h =۱/۷۵ , P =۰/۶۳؛ G_h =۰/۵۲۵ , P =۰/۹۱۳؛ G_h =۰/۰۰۰۱ , P =۱؛ G_h =۰/۴۳۱ , P =۰/۹۳۱؛ G_h =۱/۰۸۹ , P =۰/۷۸؛ G_h =۰/۰۰۵ , P =۱)، داده‌های حاصله با هم تجمیع و مورد آزمون قرار گرفتند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های بویایی‌سنجی تعیین واکنش زنبورهای ماده به میزبان و ماده‌ی غذایی که در چهار مرحله (۳۰ تکرار) انجام شد، اگر چه در همه‌ی موارد بیش از ۵۰٪ زنبورهای هر دو جمعیت به رایحه‌ی تخم و پولک بید غلات یا آب و عسل جلب شدند (شکل‌های ۱ و ۳) اما تجزیه‌ی آماری تفاوت معنی‌داری در جهت‌گیری آن‌ها به‌سمت رایحه یا هوای پاک نشان نداد (p>۰/۰۵). با وجود این، از نتایج تجمیع شده (pooled data، n=۱۲۰) چنین برمی‌آید که زنبورهای ماده‌زای آلوده به باکتری (BW^+) از نظر شناسایی و ردیابی رایحه‌ی تخم و پولک میزبان واسط و همچنین عسل برتر از زنبور دوجنسی (B) می‌باشند (جداول ۱ و ۲). از طرفی نیز واکنش بویایی زنبور نر به‌ماده‌ها نشان می‌دهد که افراد ماده‌ی جمعیت‌های غیرآلوده و آلوده به‌باکتری به‌خوبی توسط افراد نر قابل تشخیص و ردیابی هستند (p<۰/۰۰۱) (شکل‌های ۲ و ۴).



شکل ۱- پاسخ بویایی زنبور ماده‌ی جمعیت دوجنسی *Trichogramma brassicae* (B) به تخم بید غلات (SE) و آب و عسل (HN). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) تمایل داشته‌اند و از نظر آماری اختلافی با یکدیگر ندارند (P>۰/۰۵ ،n= ۱۲۰). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

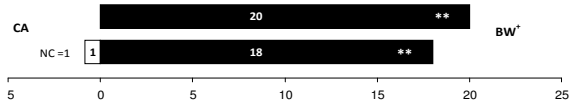
Fig. 1. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* female wasp (B: bisexual population collected from Baboulsar) to factitious host egg (SE) and honey water solution (HN). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=120, P>0.05, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.



شکل ۲- پاسخ بویایی زنبور نر جفت‌گیری نکرده *Trichogramma brassicae* به زنبور ماده‌ی باکره از همان جمعیت دوجنسی (B). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) متمایل شده‌اند و از نظر آماری تفاوت آنها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (n= ۴۰). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- پاسخ بویایی زنبور نر جفت‌گیری نکرده *Trichogramma brassicae* دوجنسی (B) به زنبور ماده‌ی باکره آلوده به *Wolbachia* (BW^+). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) متمایل شده‌اند و از نظر آماری تفاوت آنها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (n= ۴۰). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Olfactory response of bisexual *Trichogramma brassicae* unmated male wasp (B: bisexual population) to *Wolbachia*-infected virgin female (BW^+: unisexual population collected from Baboulsar). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=40, 0.001<P≤0.01, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.

جدول ۱- پاسخ بویایی زنبورهای ماده‌ی دوجنسی و ماده‌زای *Trichogramma brassicae* به تخم بید غلات در دستگاه بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل (نتایج تجمیع شده، n= ۱۲۰).

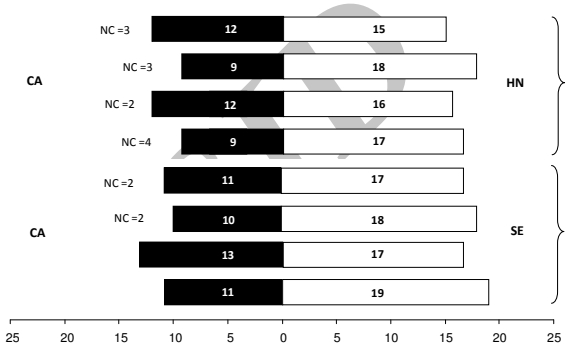
Table 1. Olfactory response of bisexual and thelytokous *Trichogramma brassicae* female wasp to factitious host egg (SE) in Y-tube olfactometer (pooled data, n=120).

T. brassicae population	number of attracted and no choice wasps			χ^2	P-value
	SE	CA	NC		
BW^+	71	45	4	5.82^*	0.015
B	65	50	5	1.95^{ns}	0.162

BW^+: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, SE: factitious host egg (*Sitotroga cerealella*), CA: clean air, NC: no choice, *: 0.01<P≤0.05, ns: non significant.

BW^+: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع‌آوری شده از بابلسر، SE: تخم بید غلات، CA: هوای پاک، NC: بی‌پاسخ. *: اختلاف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

Fig. 2. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* unmated male wasp to virgin female of the same population (B: bisexual population collected from Baboulsar). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=40, 0.001<P≤0.01, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.



شکل ۳- پاسخ بویایی زنبور ماده‌ی جمعیت تک‌جنسی *Trichogramma brassicae* آلوده به *Wolbachia* (BW^+) به تخم بید غلات (SE) و آب و عسل (HN). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی-سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) تمایل داشته‌اند و از نظر آماری اختلافی با یکدیگر ندارند (P>۰/۰۵ ،n= ۱۲۰). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* female wasp (BW^+: *Wolbachia*-infected collected from Baboulsar) to factitious host egg (SE) and honey water solution (HN). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=120, P>0.05, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- پاسخ بویایی زنبورهای ماده‌ی دوجنسی و ماده‌زای *Trichogramma brassicae* به آب و عسل در دستگاه بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل (نتایج تجمیع شده، ۱۲۰= n).

Table 2. Olfactory response of bisexual and thelytokous *Trichogramma brassicae* female wasp to honey water solution (HN) in Y-tube olfactometer (pooled data, n=120).

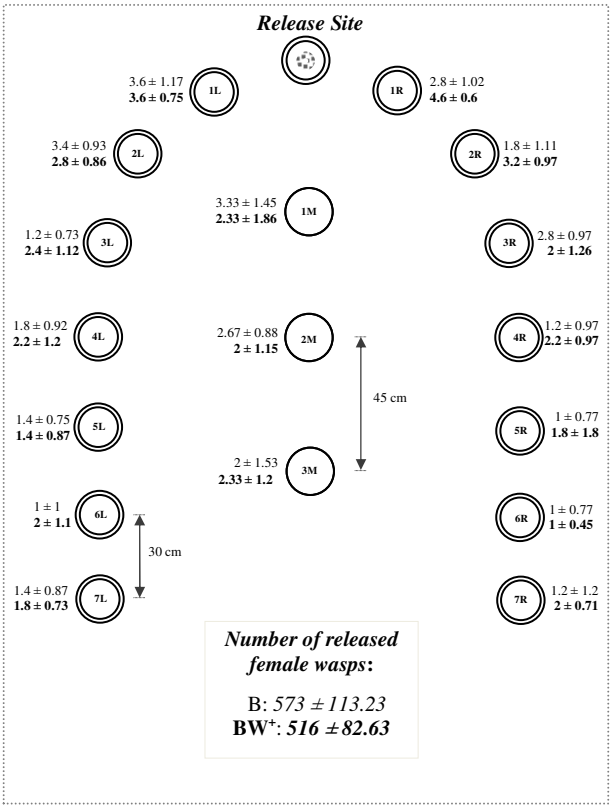
T. brassicae population	number of attracted and no choice wasps			χ^2	P-value
	HN	CA	NC		
BW^+	66	42	12	5.33^*	0.02
B	64	46	10	2.94^{ns}	0.086

BW^+: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, HN: honey water solution, CA: clean air, NC: no choice, *: $0.01<P\leq0.05$, ns: non significant.

BW^+: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع‌آوری شده از بابلسر، HN: آب و عسل، CA: هوای پاک، NC: بی‌پاسخ. *: اختلاف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

میزان پارازیتیسم و پراکنش زنبورها در شرایط اتاق حرارت ثابت

براساس نتایج به‌دست آمده در خصوص تعداد تخم و دسته‌ی تخم پارازیت شده (جدول ۳) می‌توان چنین اظهار داشت که از نظر قدرت پارازیتیسم و یافتن دستجات تخم میزبان روی گیاه ذرت، با وجود برتری عددی زنبور ماده‌زای آلوده به‌باکتری (BW^+) نسبت به‌جمعیت دوجنسی (B) به‌لحاظ آماری تفاوت آن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین نتایجی که در شکل ۵ ارایه شده، نشان می‌دهد که در مجموع جمعیت‌های B و BW^+ از نظر تعداد دسته‌ی تخم پارازیت شده روی بوته‌هایی که به فواصل مختلف از محل رهاسازی (گلدان مرکزی) به‌صورت به‌هم پیوسته قرار داشتند (گلدان‌های کناری L و R) و همچنین در بوته‌های میانی (M) که برگ‌های آن‌ها به‌یکدیگر متصل نبودند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (p>۰/۰۵). به عبارت دیگر قدرت پراکنش این دو جمعیت از طریق راه رفتن و یا پرواز مشابه یکدیگر می‌باشد، هر چند به‌طور متوسط تعداد زنبور ماده‌ی رها شده از جمعیت دوجنسی بیشتر از BW^+ بوده است (شکل ۵).



شکل ۵- موقعیت قرار گرفتن بوته‌های ذرت و میزان پارازیتیسم زنبورهای *Trichogramma brassicae* در آزمایش رهاسازی در اتاق حرارت ثابت به‌نحوی که بوته‌های دو ردیف چپ و راست (L & R) در تماس با یکدیگر بوده اما بوته‌های میانی (M) با فاصله بیشتری نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند. تعداد دسته تخم پارازیت شده در هر بوته (±SE میانگین)، به‌ترتیب برای جمعیت‌های دوجنسی (B) و ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* **(BW^+)** با اعداد ساده و پررنگ در کنار هر گلدان نمایش داده شده است. تفاوت بین دو جمعیت در هیچ یک از بوته‌ها معنی‌دار نمی‌باشد.

Fig 5. Position of corn plants and parasitism rates of bisexual (B) and thelytokous *Wolbachia*-infected (**BW^+**) *Trichogramma brassicae* on 17 corn plants in paired releases. In right and left rows (L & R), each plant touched the two adjacent, but in middle row (M), the plants were separate from another. Bold numbers represent mean quantity of sentinel egg masses parasitized by *Wolbachia*-infected line (**BW^+**) at each plant (±SE) (n=5, P>0.05).

Archive of SID

www.SID.ir

به‌دلیل تفاوت نسبت جنسی زنبورهای ماده‌زا و دوجنسی، میزان پارازیتیسم ۱۰۰ عدد زنبور ماده‌زا (BW^+) روی گیاه ذرت بیش از زنبور دوجنسی (B) برآورد شد (جدول ۳). البته این برتری تنها از لحاظ تعداد دسته‌ی تخم پارازیته (جمعیت ماده‌زا ۶/۰۱ دسته تخم، جمعیت دوجنسی ۲/۸۸ دسته تخم) معنی‌دار می‌باشد ($p=۰/۰۲۸۶$) و با وجود آنکه میانگین تعداد تخم پارزیت شده به‌وسیله‌ی ۱۰۰ عدد زنبور ماده‌زا و دوجنسی به‌ترتیب ۳۶۴/۳۵ و ۱۵۴/۴۲ عدد تعیین شد، اما از نظر آماری تفاوتی محسوب نمی‌شود ($p >۰/۰۵$).

بحث

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده در مبحث رفتار و بویایی سنجی حاکی از آن است که باکتری *Wolbachia* در جمعیت‌های مختلط زنبور تریکوگراما اثر منفی روی غدد تولیدکننده‌ی فرمون جنسی و گیرنده‌های حسی محرک‌های شیمیایی زنبورهای تک‌جنسی ماده‌زا (BW^+) ندارد. اگر چه زنبورهای ماده‌زای *E. mundus* و *T. cordubensis* که تمام افراد جمعیت آن‌ها به باکتری آلوده هستند، قادر به تولید فرمون جنسی نمی‌باشند (Silva & Stouthamer, 1997 و Ardeh, 2005)، اما تولید فرمون جنسی توسط زنبورهای ماده‌زای جمعیت مختلط *T. brassicae* بابلسر (BW^+) و جفت‌گیری با نرهای هم‌گونه‌ی آن‌ها در جمعیت B که افراد آلوده و غیرآلوده از نظر ژنتیکی غیرقابل تفکیک می‌باشند، به‌دلیل آن‌که آلودگی آن‌ها تثبیت نشده و قابل برگشت به حالت دوجنسی است، طبیعی به‌نظر می‌رسد (مکاتبات شخصی با پروفسور Stouthamer). نتایج بررسی‌های انجام شده توسط Almeida (2004) نیز حاکی از عدم تأثیر باکتری *Wolbachia* بر سرعت راه رفتن و دیگر صفات رفتاری زنبور *T. atopovirilia* بوده است.

وینسون علایم شیمیایی ساطع شده از تخم و مواد پوشش‌دهنده آن، فرمون‌ها، پولک و بقایای مربوط به پروانه‌ها را برای پارازیتوییدهای تخم به‌عنوان کیرومون (kairomone) معرفی کرده است (Vinson, 1988). در این پژوهش گرچه نسبت زنبورهای ماده‌ی آلوده به ولباخیا (BW^+) که در آزمون بویایی‌سنجی به تخم آلوده به پولک میزبان و همچنین عسل واکنش نشان دادند، در مقایسه با ماده‌های غیرآلوده بیشتر بوده (جداول ۱ و ۲)، اما نمی‌توان دلیل علمی خاصی را برای آن در نظر گرفت. اما این امر نشان می‌دهد که باکتری ولباخیا در شرایطی که در جمعیت زنبور تریکوگراما تثبیت شده باشد، دست‌کم تأثیر منفی بر میزبان خود تحمیل نمی‌کند. به‌طور کلی عدم واکنش مناسب زنبورهای ماده این دو جمعیت به تخم میزبان، می‌تواند به پرورش مستمر چندین نسل از این زنبورها در محیط محدود و اشباع شده‌ی انسکتاریوم از رایحه و ترکیبات شیمیایی وابسته به بید غلات (مانند فرمون جنسی، تخم و پولک) و پایین آمدن حساسیت این جمعیت‌ها نسبت به علایم شیمیایی میزبان واسط مرتبط باشد. البته در اغلب موارد رایحه‌ی مربوط به تخم و پولک پروانه‌ها به‌عنوان یک کیرومون برای زنبورهای تریکوگراما حالت متوقف‌کننده (arrestant) دارد (به نقل از: Fatouros *et al.*, 2008). در آزمایشی که Fatouros (2006) با استفاده از بویایی‌سنج لوله‌ای Y شکل انجام داد، زنبورهای *T. brassicae* نیز به رایحه‌ی برگ کلم حاوی تخم‌های *Pieris brassicae* (L.) جلب نشدند. در هر صورت، بالا بودن تعداد افراد بی‌پاسخ در آزمون بویایی‌سنجی زنبورهای ماده به تخم میزبان و آب و عسل ایجاب می‌کند تا در بررسی‌های تکمیلی ضمن ایجاد برخی تغییرات اصلاحی در قطر لوله و زاویه‌ی بین بازوها لوله‌ی Y شکل و غلظت رایحه‌ی مورد نظر، از مواد و ترکیبات دیگری مانند فرمون جنسی، پولک و یا پروانه‌ی بالغ آفت هدف استفاده شود. بدیهی است که افزایش موارد تحقیقاتی مشابه در این زمینه امکان بحث و نتیجه‌گیری بهتری را فراهم خواهد نمود.

در آزمایشی که به‌منظور تعیین قدرت پراکنش و پارازیتیسم جمعیت‌های ماده‌زا و دوجنسی روی بوته‌های ذرت به انجام رسید، گرچه میانگین تعداد تخم و دستجات تخم پارازیت شده به‌وسیله‌ی یک زنبور ماده‌ی آلوده به باکتری (BW^+) بیشتر از جمعیت دوجنسی B به‌دست آمد، اما تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در مقایسه‌ی میزان پارازیتیسم دو جمعیت در هر یک از

Archive of SID

www.SID.ir

بوته‌های جانبی و میانی و نیز در گلدان‌هایی که نسبت به محل رهاسازی در فواصل دور، متوسط و نزدیک قرار گرفته‌اند، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳). این امر نشان می‌دهد که این دو جمعیت به‌صورت انفرادی از نظر میزان پارازیتیسم، قدرت یافتن دسته‌های تخم میزبان و قدرت پراکنش به هر دو شیوه‌ی راه رفتن روی برگ و پرواز کردن تفاوتی با یکدیگر ندارند. میزان قدرت جستجو (a) یا نرخ حمله‌ی برآورد شده برای آن‌ها در بررسی‌های فرخی و همکاران (۲۰۱۰) نیز با نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای هم‌خوانی دارد، به این صورت که با وجود برتری عددی قدرت جستجوی زنبور ماده‌زا (BW^+) نسبت به زنبور دوجنسی، اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد. در مجموع نیز این دو جمعیت از نظر قدرت پارازیتیسم دسته‌ی تخم میزبان تفاوتی با یکدیگر ندارند (جدول ۳). اما به لحاظ تعداد دسته‌ی تخم پارازیت شده به‌ازای ۱۰۰ عدد زنبور نر و ماده، زنبورهای تک‌جنسی آلوده به *Wolbachia* برتری محسوسی نسبت به جمعیت دوجنسی (B) دارند (α =۰/۰۵)، که علت را می‌توان به تفاوت در نسبت جنسی و فقدان زنبور نر در جمعیت ماده‌زا و در نتیجه عدم نیاز به جفت‌گیری و صرف زمان مربوطه نسبت داد. در آزمایش گلخانه‌ای مشابهی که Silva *et al.* (2000)، برای مقایسه‌ی جمعیت‌های دوجنسی و آلوده به باکتری در دو گونه زنبور *T. cordubensis* و *T. deion* روی گوجه‌فرنگی انجام دادند تفاوت معنی‌داری در تعداد دسته‌ی تخم‌های پارازیت شده توسط یک زنبور ماده مشاهده نکردند، ضمن آنکه نتایج آن‌ها نیز در خصوص پارازیتیسم حاصل از رهاسازی ۱۰۰ عدد زنبور، حاکی از برتری جمعیت‌های آلوده به باکتری می‌باشد. اما جمعیت‌های دوجنسی به‌طور متوسط تعداد تخم‌های بیشتری را پارازیت کرده بودند.

از نتایج آزمایش‌ها در مجموع چنین به‌نظر می‌رسد که آلودگی به *Wolbachia* در جمعیت‌های مختلط باعث اختلال در تولید فرمون جنسی زنبور ماده نشده، همچنین تأثیری نیز بر قدرت جستجو و میزان پارازیتیسم پارازیتوییدهای بررسی شده در شرایط آزمایشگاهی نمی‌گذارد. برای اطمینان هرچه بیشتر و تأیید نتایج به‌دست آمده لازم است در تحقیقات تکمیلی ضمن مقایسه‌ی جمعیت‌های بیشتر، از جمعیت آلوده‌ی معالجه شده با آنتی‌بیوتیک نیز با وجود اثرات جانبی که می‌تواند روی زنبور داشته باشد به‌همراه تیمار آلوده (ماده‌زا) و غیرآلوده‌ی طبیعی استفاده شود (Silva *et al.*, 2000). با وجودیکه از لحاظ قدرت پراکنش و پارازیتیسم این جمعیت ماده‌زای آلوده به باکتری (BW^+) تفاوتی با زنبور دوجنسی هم‌گونه‌ی خود ندارد، اما از جنبه‌ی کاربردی در صورت رهاسازی تعداد یکسانی از این دو جمعیت در شرایط مناسب طبیعی، انتظار می‌رود جمعیت ماده‌زا از کارایی بیشتری برخوردار باشد. همچنین گرچه در آزمایش‌های قبلی زمان دستیابی جمعیت آلوده بیشتر از زنبور دوجنسی برآورد شده است (Farrokhi *et al.*, 2010)، اما این اختلاف می‌تواند برای کنترل ساقه خوارهای ذرت و برنج که به‌صورت دسته‌ای تخم‌ریزی می‌کنند از اهمیت کمتری برخوردار باشد. بدیهی است با وجود مزیت‌های اقتصادی استفاده از پارازیتوییدهای ماده‌زا و همچنین نتایج به‌دست آمده از مجموعه پژوهش‌هایی که تاکنون انجام شده، لازم است پیش از هر گونه توصیه کاربردی برای استفاده از این لاین تک‌جنسی (Tbra-B11)، آزمایش‌های تکمیلی نیز در سطح مزرعه انجام شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله ضمن قدردانی از همکاری آقای احمدعلی اکبری در پرورش میزبان واسط و حفظ جمعیت‌های زنبور، از آقای دکتر حمیدرضا صراف معیری که در ارزیابی نتایج ما را از نظرات خود بهره‌مند نمودند، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به انجام رسیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- میزان پارازیتیسم حاصل از رهاسازی دو جمعیت ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* و دوجنسی زنبور *Trichogramma brassicae* روی بوته‌های ذرت در شرایط آزمایشگاهی.

Table 3. Parasitism by released thelytokous *Wolbachia*-infected and bisexual *Trichogramma brassicae* wasps on corn plants in laboratory conditions (**M±SE**).

***T. brassicae* population**	**Line**	**Female proportion (Sex Ratio)**	**Mean number of parasitized eggs per female**	**Number of eggs parasitized per 100 wasps**	**Mean number of parasitized egg masses per female**	**Number of egg masses parasitized per 100 wasps**
BW^+	Unisexual (Thelytokous)	1	3.64 ± 2.55^{ns}	364.35^{ns}	0.06 ± 0.01^{ns}	6.01^{*}
B	Bisexual (Arrhenotokous)	0.69	2.43±1.68	154.42	0.04±0.01	2.88

BW^+: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, *: $0.01<P\leq0.05$, ns: non significant, n=5.

BW^+: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع‌آوری شده از بابلسر، *: اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است.
ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

Archive of SID

References

Almeida, R. 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 142 pp.

Ardeh, M. J. 2005. Whitefly control potential of *Eretmocerus* parasitoids with different reproductive modes. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 104 pp.

Attaran, M. R. & Dadpour Moghanloo, H. 2011. An analytical review of present status and future prospective in utilization of *Trichogramma* wasps for biological control of agricultural pests in Iran. Proceeding of the biological control development congress in Iran, 27-28 July, Tehran, Iran, 94-112.

Bigler, F. 1989. Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. Journal of Applied Entomology. 108: 390-400.

Bigler, F., Bieri, M., Fritschy, A. & Seidel, K. 1988. Variation in locomotion between laboratory strains of *Trichogramma maidis* and its impact on parasitism of eggs of *Ostrinia nubilalis* in the field. Entomologia Experimentalis et Applicata. 49: 283-290.

Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. & O'Neill, S. L. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. Journal of Bacteriology. 180: 2373–2378.

Cerutti, F. & Bigler, F. 1995. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. Entomologia Experimentalis et Applicata. 75: 19-26.

Ebrahimi, E., Pintureau, B. & Shojai, M. 1998. Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. Applied Entomology and Pathology. 66: 39-43 (In Persian with English summary).

Farrokhi, S. 2010. Evaluation of *Wolbachia* impact on biological characteristics of thelytokous *Trichogramma brassicae*. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Iran, 153 pp. (In Persian with English summary).

www.SID.ir

Farrokhi, S., Ashouri, A., Shirazi, J., Allahyari, H. & Huigens, M.E. 2010. A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. Journal of Insect Science. 10(167).

Fathipour, Y., Kamali, K., Khalghani, J. & Abdollahi, G. 2000. Functional response of *Trissolcus grandis* (Hym., Scelionidae) on different egg densities of *Eurygaster integriceps* (Het., Scutelleridae) and effects of different wheat genotypes on it. Applied Entomology and Phytopathology. 68: 1-17 (In Persian with English summary).

Fatouros, N. E. 2006. Parasitic wasps on butterfly expedition: Foraging strategies of egg and larval parasitoids exploiting infochemicals of brussels sprouts and their *Pieris* hosts. Ph.D. Thesis, Freie Universität Berlin, 181 pp.

Fatouros, N. E., Dicke, M., Mumm, R., Meiners, T. & Hilker, M. 2008. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. Behavioral Ecology. 19(3): 677-689.

Godfray, H. C. J. 1994. Parasitoids. Princeton University Press, Chichester, West Sussex.

Gonçalves, C. I., Huigens, M. E., Verbaarschot, P., Duarte, S., Mexia, A. & Tavares, J. 2006. Natural occurrence of *Wolbachia*-infected and uninfected *Trichogramma* species in tomato fields in Portugal. Biological Control. 37: 375-381.

Hassan, S. A. 1988. Choice of the suitable *Trichogramma* species to control the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hbn. and the cotton bollworm *Heliothis armigera* Hbn. Colloques de l'INRA. 43: 197-198.

Hassan, S. A. 1990. A simple method to select effective *Trichogramma* strains for use in biological control. pp. 201-205 In: Wajnberg, E. & Vinson, S. B. (eds), *Trichogramma* and other egg parasitoids, Les Colloques de l'INRA 56.

Hohmann, C. L., Luck, R. F. & Stouthamer, R. 2001. Effect of *Wolbachia* on the survival and reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Neotropical Entomology. 30(4).

Huigens, M. E., Hohmann, C. L., Luck, R. F., Gort, G. & Stouthamer, R. 2004. Reduced competitive ability due to *Wolbachia* infection in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 110: 115-123.

Huigens, M. E. & Stouthamer, R. 2003. Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. pp. 247-266. In: Bourtzis, K. & Miller, T. A. (eds), Insect symbiosis. CRC Press.

Kalyebi, A., Overholt, W. A., Schulthess, F., Mueke, J. M., Hassan, S. A. & Sithanantham, A. 2005. Functional response of six indigenous trichogrammatid egg parasitoids (Hym., Trichogrammatidae) in Kenya: influence of temperature and relative humidity. Biological Control. 32: 164-171.

Li, Y. L. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. pp. 37-55. In: E. Wajnberg, & S. A. Hassan (eds), Biological control with egg parasitoids, CAB International.

Miura, K. & Tagami, Y. 2004. Comparison of life history characters of arrhenotokous and *Wolbachia*-associated thelytokous *Trichogramma kaykai* Pinto and Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Annals of the Entomological Society of America. 97(4): 765-769.

Moayeri, H. R. S., Ashouri. A., Goldansaz, S. H., Mohaghegh, J., Poll, L. & Enkegaard, A. 2008. Olfactory response of the predatory mirid bug, *Macrolophus caliginosus* (Het., Miridae) to clean and infested green bean with two-spotted spider mite and identification of their volatile compounds by using GC-MS technique. Journal of Entomological Society of Iran. 27(2), 79-92.

Archive of SID

www.SID.ir

Moezipour, M., Kafil, M. & Allahyari, H. 2008. Functional response of *Trichogramma brassicae* at different temperatures and relative humidities. Bulletin of Insectology. 62(2): 245-250.

Peng, Y. & Wang, Y. 2009. Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. Chinese Science Bulletin. 54(8): 1369-1375.

Pompanon, F., Schepper, B., Mourer, Y., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 1997. Evidence for a substrate-borne sex pheromone in the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. Journal of Chemical Ecology. 23: 1349-1360.

Quicke, D. L. J. 1997. Parasitic wasps. Chapman & Hall.

Reay-Jones, F. P. F., Rochat, J., Goebel, R. & Tabone, E. 2006. Functional response of *Trichogramma chilonis* to *Galleria mellonella* and *Chilo sacchariphagus* eggs. Entomologia Experimentalis et Applicata. 118: 229-236.

Silva, I. M. M. S. 1999. Identification and evaluation of *Trichogramma* parasitoids for biological pest control. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 151 pp.

Silva, I. M. M. S., van Meer, M. M. M., Roskan, M. M., Hoogenboom, A., Gort, G. & Stouthamer, R. 2000. Biological potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strain. Biocontrol Science and Technology. 10: 223-228.

Silva, I. M. M. S. & Stouthamer, R. 1997. To mate or not to mate… Can sex pheromones be used as taxonomic tool in *Trichogramma* spp.? Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV). 8: 41-46.

Smith, S. M. 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and their potential use. Annual Review of Entomology. 41: 375-406.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. Biometry, 3rd ed. Freeman, New York, USA.

Stouthamer, R. 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. Entomophaga. 38: 3-6.

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Luck, R. F. & Werren, J. H. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. Nature. 361: 66-68.

Stouthamer, R., Hu, J., van Kan, F. J. P. M., Platner, G. R. & Pinto, J. D. 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. BioControl. 43: 421-440.

Stouthamer, R. & Luck, R. F. 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 67: 183-192.

Tagami, Y., Miura, K. & Stouthamer, R. 2001. How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? Journal of Invertebrate Pathology. 78: 267-271.

Takabayashi, J. & Dicke, M. 1992. Response of predatory mites with different rearing histories to volatiles of uninfested plants. Entomologia Experimentalis et Applicata. 64: 187-193.

Tripathi, R. N. & Singh, R. 1990. Mating behavior of *Lysiphlebia mirzai* Shuja-Uddin (Hymenoptera: Aphididae), a parasitoid of *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hem., Aphididae). Entomon. 15: 21-26.

van Hezewijk, B. H., Bourchier, R. S. & Smith, S. M. 2000. Searching speed of *Trichogramma minutum* and its potential as a measure of parasitoid quality. Biological Control. 17: 139-146.

Archive of SID

www.SID.ir

van Lenteren, J. C. 2000. Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. pp. 77-103. In: Gurr, G. & Wratten, S. (eds), Biological control: Measure of success. Kluwer, Academic Publisher.

Vinson, S. B. 1988. Comparison of host characteristics that elicit host recognition behavior of parasitoid hymenoptera. pp. 285-291. In: Gupta, V. K. (ed), Advances in parasitic hymenoptera research. Brill, Leiden.

Wang, B. & Ferro, D. N. 1998. Functional response of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to *Ostriniae nubilalis* (Lep., Pyralidae) under laboratory and field conditions. Environmental Entomology. 27: 752-758.

Archive of SID

www.SID.ir

Wolbachia effect on olfactory responses and parasitism rate of *Trichogramma brassicae* in laboratory conditions

Shahram Farrokhi, Jalal Shirazi and Mohammad Reza Attaran

Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection

Corresponding author: Shahram Farrokhi, shahram.farrokhi@gmail.com

Received: July. 26, 2012 **1 (1) 65-79** **Accepted: Jan. 1, 2013**

Abstract

Trichogramma wasps (Hym., Trichogrammatidae) are frequently used as egg parasitoid and biological control agent of lepidopteran pests. These haplodiploid wasps display two reproductive modes, including thelytoky and arrhenotoky. The thelytoky (unisexuality) are often associated with the presence of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria (α-proteobacteria). The use of thelytokous parasitoids has long been considered as a way to enhance the biocontrol efficacy. In this study a series of experiments were conducted to compare the behavioral aspects, dispersal potential and parasitism of thelytokous (BW^+) and bisexual (B) *Trichogramma brassicae* strains (Baboulsar ecotype) at 25°C in laboratory conditions. By using Y-tube olfactometer, it was observed that the *Wolbachia* infection in the Baboulsar strain (mixed population) neither affected the wasp's response to volatile odors of honey water solution and factitious host eggs nor did it interfere with female wasp's sex pheromone emission. Greenhouse release tests on corn plants, resulted in non significant differences between the strains taking the number of parasitized eggs per one female wasp into consideration. However, based on releasing 100 wasps (male and female in the case of bisexual), the number of egg masses parasitized by thelytokous *T. brassicae* (6.01) was significantly higher than B strain (2.88). Therefore, this thelytokous line of *Trichogramma* might be superior to bisexual conspecifics under more natural conditions and hence have a higher potential in pest control.

Keywords: *Trichogramma brassicae*, unisexual, *Wolbachia*, Y-tube olfactometer, thelytoky, dispersal, Corn

Archive of SID

www.SID.ir