

مطالعه نقش *Wolbachia* در ماده‌زایی جمعیتی از زنبورهای تریکوگرامای ایران

Study on the effect of *Wolbachia* on the thelytoky of an Iranian strain of *Trichogramma*

ابراهیم ابراهیمی

موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران

چکیده

پدیده ماده‌زایی (Thelytoky) در زنبورهای تریکوگراما ممکن است در اثر فعالیت گونه‌ای ریکتزیا به نام *Wolbachia trichogrammae* در تخمدان زنبور ماده بروز کند و این میکروارگانیسم توسط تخم به نتاج منتقل می‌شود. ماده‌زایی همچنین ممکن است بدون وجود این میکروارگانیسم، در اثر هیبریدیزاسیون یا سایر عوامل در این زنبورها مشاهده شود. به منظور مشخص شدن علت ماده‌زایی در جمعیتی ماده‌زا از گونه *Trichogramma embryophagum*، اقدام به آزمایش با روش PCR گردید و وجود این ریکتزیا در جمعیت ماده‌زای ایران به اثبات رسید. اهمیت پدیده ماده‌زایی از نظر کاربرد این زنبورها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات مختصراً مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: ماده‌زایی، *Wolbachia*، زنبور تریکوگراما

مقدمه

بطور معمول در راسته بال غشائیان (Hymenoptera) نرها هاپلوئید و ماده‌ها دیپلوئید می‌باشند، لذا زنبور مادر بدون تلقیح تخمک با اسپرماتوزوئید نر تولید نتاج نر (n کروموزومی) و در صورت تلقیح آن با اسپرماتوزوئید نر تولید نتاج ماده (2n کروموزومی) می‌کند، لیکن در تعدادی از زنبورها حالت Thelytoky یا ماده‌زایی وجود دارد و ماده‌های باکره (Virgin) نیز تولید اولاد ماده می‌کنند. حالت ماده‌زایی در بیش از ۲۰ خانواده، ۱۰۸ جنس و ۲۰۵ گونه از بال غشائیان گزارش شده است

در زنبورهای جنس *Trichogramma* ماده‌زائی دارای دو علت است:

۱- منشاء ژنتیکی

۲- وجود میکروارگانیزم‌های هم‌زیست

علت ماده‌زائی با منشاء ژنتیکی به خوبی روشن نیست و ممکن است در اثر ژن‌های خاص و یا در نتیجه هسپریدیدزاسیون و ناسازگاری سیتوپلاسمی ناشی از آن حاصل شود (Pinto & Stouthamer, 1994). این حالت از ماده‌زائی قابل برگشت به حالت عادی تولید مثل نیست.

در ماده‌زائی ایجاد شده توسط میکروارگانیزم‌ها گونه‌ای ریکتریا به نام *Wolbachia trichogrammae* Louis & Pintureau به عنوان عامل ایجاد کننده ماده‌زائی در زنبورهای ماده یافت شده است. این میکروارگانیزم به صورت درون سلولی (Intracellular) و داخل سلولهای Oocyte در تخمدان‌ها فعالیت می‌کند و از نسلی به نسل بعد منتقل می‌شود. دیپلوئید شدن کروموزوم‌ها در ماده‌زائی حاصل از *Wolbachia* در نتیجه ترکیب محصولات اولین تقسیم میتوز که شکلی از Duplication گامت است ذکر گردیده است (Pinto & Stouthamer, 1994).

ماده‌زائی ایجاد شده توسط *Wolbachia* را می‌توان به دو طریق به تولید مثل معمولی تبدیل نمود:

۱- قرار دادن زنبورهای ماده در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد که حرارت سبب از بین رفتن یا غیر فعال شدن میکروارگانیزم گردیده و افراد نر در جمعیت ظاهر می‌شوند.

۲- خوراندن آنتی‌بیوتیک به افراد ماده که به این منظور آنتی‌بیوتیک به نسبت ۱۰۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر عسل حل شده و در اختیار زنبورها قرار داده می‌شود (Stouthamer et al. 1990b).

در بسیاری از موارد نرهای حاصل از این دو روش عقیم هستند، اما مواردی از بارور بودن نرها هم گزارش شده است.

به منظور تشخیص منشاء ماده‌زائی در جمعیت ماده‌زای ایران از آزمایش PCR (Polymerase Chain Reaction) استفاده شد.

روش بررسی

در این بررسی ده جمعیت از مشهد، آمل، ارومیه (۲ جمعیت)، ساوه، چالوس، ورامین، قزوین، یزد و تنکابن انتخاب شد که تنها در یک جمعیت (ارومیه -۱) حالت ماده‌زایی مشاهده شده بود.

زنبورهای مورد مطالعه روی تخم پروانه بید آرد (*Ephesia kuehniella*)، داخل لوله‌های شیشه‌ای به قطر یک و طول ده سانتیمتر در دمای 10 ± 24 ، رطوبت نسبی حدود ۷۰٪ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند و زنبورهای زنده بالغ نسل سوم (F3) به دمای 70 - درجه سانتیگراد منتقل شدند.

برای جداسازی DNA از روش Chelex DNA Isolation Protocol استفاده شد (Van Kan et al., 1996) و روش کار انستیتوی ملی علوم کاربردی، لیون، فرانسه، منتشر نشده). ابتدا به تعداد نمونه‌ها، لوله‌های اپندرف (Ependorf) در نظر گرفته و در هر کدام ۴۰ میکرولیتر محلول Chelex ریخته شد، سپس از هر جمعیت ۱۰ تا ۲۰ حشره کامل به لوله‌های محتوی Chelex منتقل شده و با میله شیشه‌ای له گردیدند، به گونه‌ای که رنگ شفاف محلول تیره شد. پس از آن به هر لوله ۱/۵ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شد و پس از بهم زدن و سانتریفوژ کوتاه مدت (حدود ۵ ثانیه)، لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای 56 و به دنبال آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 96 قرار داده شدند. سپس ۲ میکرولیتر از DNA عصاره‌گیری شده به ۲۳ میکرولیتر از محلول مادر (Master mix) مرکب از مواد زیر برای هر لوله افزوده شد:

میکرولیتر برای هر تیوب	۲/۵	بافر PCF
" " " " "	۲	dNTP's
" " " " "	۰/۷۵	Primer (forward)
" " " " "	۰/۷۵	Primer (reverse)
" " " " "	۰/۱۵	Taq polymerase
" " " " "	۱۶/۸۵	آب مقطر استریل

همچنین ۲ نمونه به عنوان شاهد دارای *Wolbachia* و ۲ نمونه به عنوان شاهد فاقد آن در نظر گرفته شد. کلیه عملیات روی حمام یخ انجام گرفت. نمونه‌های شاهد مثبت و منفی از جمعیت‌های در حال پرورش در آزمایشگاه بیولوژی انستیتوی علوم کاربردی فرانسه انتخاب شد و پرایمرها نیز توسط آن آزمایشگاه سفارش داده شده بود.

در مرحله بعد لوله‌ها در ماشین PCR قرار گرفته و برنامه به صورت زیر تنظیم گردید:

Cooldown 10 °C, 94 °C, 35 * (30 °C, 97 °C, 45 °C, 51 °C, 45 °C, 72 °C),

[۴ دقیقه در 94 °C و به دنبال آن ۳۵ بار چرخه داخل پرائمر: (۳۰ ثانیه در 97 °C، ۴۵ ثانیه در 51 °C، ۴۵

ثانیه در 72 °C) و پس از آن ۵ دقیقه در 72 °C و خنک شدن نهائی تا 10 °C].

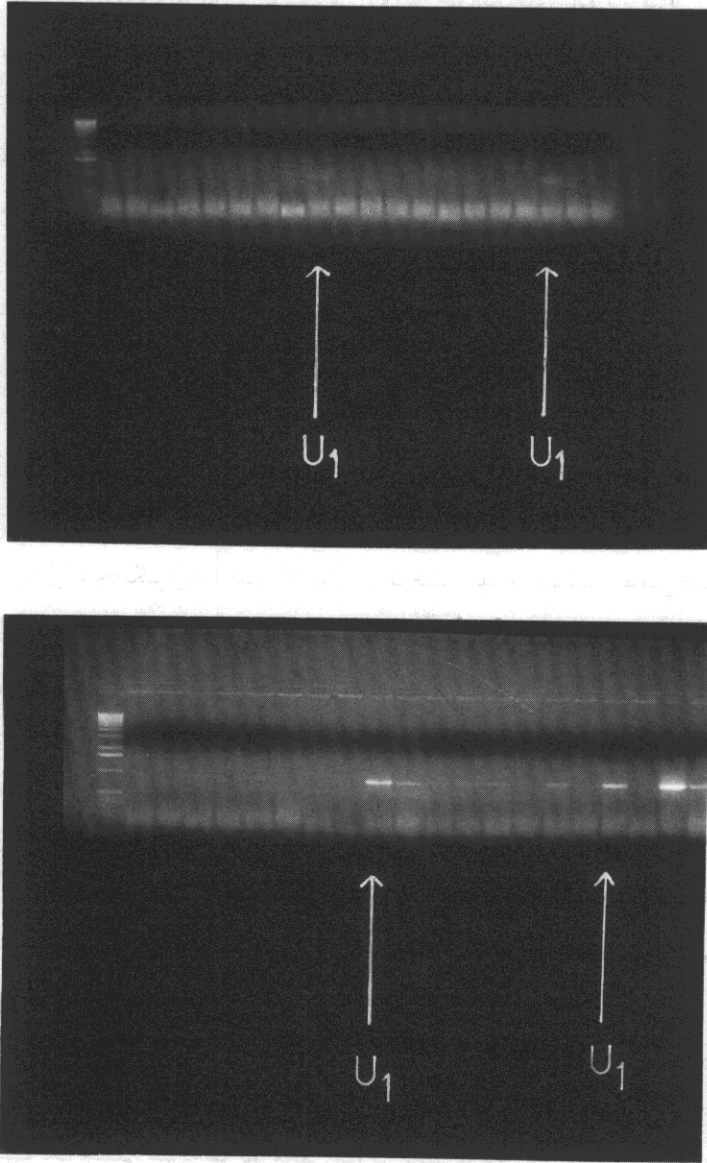
پس از پایان کار دستگاه PCR، به هر نمونه ۵ میکرولیتر بروموفنل افزوده شد و ۲۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه و بروموفنل داخل هر چاهک ژل آگارز جهت انجام الکتروفورز افقی قرار گرفت. برای ساختن ژل آگارز، ۱/۵ گرم آگارز با ۱۵۰ میلی لیتر محلول TEA (Tris Ethyl Amid) مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه داخل آن حرارت داده شد. پس از خنک شدن (در حرارت اتاق) مقدار ۷۵ میکرولیتر اتیدیم بروماید (Ethidium bromide) جهت رنگ آمیزی به آن افزوده شد (اتیدیم بروماید باید پس از خنک شدن محلول افزوده شود چون دارای بخار سمی و خطرناک است). محلول حاصل در مخزن الکتروفورز افقی ریخته شده و شانه در جای خود قرار داده شد. پس از حدود ۱۵ دقیقه ژل تشکیل شده و در تانک الکتروفورز که حاوی محلول TEA به عنوان بافر بود قرار داده شد، به طوری که بافر تا حدی روی ژل را فراگرفت و سپس شانه از ژل خارج گردید. پس از آنکه نمونه‌ها به وسیله میکرواپلیکاتور داخل چاهک‌های ژل ریخته شد، الکتروفورز با ولتاژ ۵۵ شروع شده و پس از ۱۰ دقیقه روی ۸۰ ولت تنظیم گردید. پس از ۹۰ دقیقه ژل خارج شده و در تاریکخانه زیر نور ماوراء بنفش باندهای تشکیل شده مشاهده شد و با دوربین پولاروید از آن عکس تهیه گردید.

در صورت وجود *Wolbachia* در نمونه‌های مورد آزمایش، در اثر جفت شدن رشته مورد نظر از DNA با پرایمرهای خاص آن و افزایش آن در اثر ازدیاد متوالی و تصاعدی طی مراحل PCR، باندهای مربوطه روی ژل مشخص خواهند بود.

نتیجه و بحث

از ۱۰ جمعیت مورد مطالعه، جمعیت ارومیه - ۱ آلوده به *Wolbachia* بود (شکل ۱) که با مشاهدات قبلی هم وجود حالت ماده‌زائی در آن مشخص شده بود و معلوم شد که ماده‌زائی در این جمعیت حالت ژنتیکی نداشته و به علت وجود ریکتزیای *Wolbachia trichogrammae* است. این جمعیت از گونه *Trichogramma embryophagum* Hartig تشخیص داده شد. این اولین گزارش از وجود این ریکتزیای در ایران است.

چنانچه ذکر شد بعضی از جمعیت‌های جنس *Trichogramma* دارای ماده‌زائی (Thelytoky) هستند و زنبور ماده جفت‌گیری نکرده قادر به تولید نتاج ماده می‌باشد. این پدیده ممکن است در پرورش انبوه و رها سازی به منظور کنترل بیولوژیک اهمیت داشته باشد زیرا در واقع دز موثر رها سازی زنبورها را افراد ماده تشکیل می‌دهند که می‌توانند با تخم گذاری داخل تخم‌های میزبان



شکل ۱- تصویر باندهای به دست آمده پس از PCR و الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز به منظور آزمایش وجود *Wolbachia*.

Fig. 1- DNA Banding pattern in *Trichogramma* showing the presence of the symbiont *Wolbachia*.

سبب از بین رفتن آنها شوند. به این ترتیب می توان در جمعیت های ماده‌ها از میزان رها سازی در واحد سطح کاست. با توجه به این، رها سازی جمعیت های ماده‌ها مقرون به صرفه خواهد بود، لیکن ملاحظاتی را در این زمینه باید در نظر گرفت:

- جمعیت های دو جنسی سریعتر به تغییر شرایط محیط سازش می یابند، بنابراین در صورتیکه به هر علتی محل رها سازی از جهات مختلف با منطقه‌ای که زنبور از آنجا جمع آوری شده است متفاوت باشد، در آن منطقه جمعیت های دو جنسی ممکن است مزیت داشته باشند.

- چون جمعیت یک جنسی (ماده‌ها) تخم های میزبان را صرف تولید افراد نر نمی کند، بنابراین میزان افزایش جمعیت بیشتری خواهد داشت و در پرورش انبوه نیز هزینه تولید پایین خواهد آمد.

- جمعیت های دو جنسی باید برای تولید نتاج ماده جفتگیری کنند و در مناطقی که تراکم زنبورها خیلی پایین است، نر و ماده ممکن است در یافتن یکدیگر دچار مشکل شوند ولی جمعیت های ماده‌ها نیازی به جفتگیری ندارند و لذا بهتر در طبیعت حفظ می شوند. به همین دلیل رها سازی جمعیت های ماده‌ها در نقاطی که جمعیت های دو جنسی وجود دارند ممکن است منجر به غلبه جمعیت های ماده‌ها شود (Stouthamer, 1993).

باتوجه به موارد فوق، در رها سازی جمعیت های دو جنسی و یک جنسی باید نکات زیر را در نظر گرفت،

۱- در مواردیکه تراکم میزبان خیلی بالاست باید ابتدا جمعیت های دو جنسی رها سازی شوند زیرا توانایی بیشتری در کاهش جمعیت آفت و افزایش جمعیت خود دارند. هنگامی که جمعیت دو جنسی تراکم میزبان را کاهش داد می توان جمعیت های ماده‌ها را رها سازی کرد. این ماده‌ها با نر های حاصل از جمعیت دو جنسی جفت گیری خواهند کرد و متعاقباً ژنوتیپ جمعیت دو جنسی به جمعیت بکرزا وارد خواهد شد (Stouthamer, 1993). در صورتیکه جمعیت دو جنسی به طور ژنتیکی به شرایط محلی سازش یافته باشد، چنین انتقالی باعث خواهد شد که جمعیت یک جنسی هم به شرایط محلی سازش یابد. علاوه بر این جمعیت ماده‌ها می تواند تراکم میزبان را به سطحی پایین تر برساند.

۲- وقتی تراکم میزبان خیلی پایین است استقرار جمعیت دو جنسی زنبور به علت اینکه افراد نر و ماده در یافتن یکدیگر دچار اشکال می شوند مشکل است و بهتر است جمعیت یک جنسی رها سازی شود.

۳- در مورد میزبان هایی که به صورت لکه‌ای گسترش دارند ممکن است جمعیت‌های ماده‌زا کنترل بهتری ایجاد کنند.

۴- برای رهاسازی انبوه در سطح وسیع، استفاده از جمعیت‌های ماده‌زا به علت کاهش هزینه تولید در موارد خاص ترجیح داده می‌شوند.

تناوب ذکر شده بین جمعیت ماده‌زا و نرزا (دوجنسی) در مواقعی مفید است که هر دو جمعیت از یک گونه بوده و نرهای جمعیت دو جنسی به سوی ماده‌های جمعیت یک جنسی جلب شوند، در غیر این صورت جمعیت‌های دو جنسی و یک جنسی فقط در رقابت برای میزبان و نه در جفت‌گیری روی هم اثر می‌گذارند و در این حالت جمعیت دو جنسی بهتر می‌تواند جمعیت یک جنسی و بکرز را تحت تاثیر قرار دهد (Stouthamer, 1993).

در ایران، در منطقه ارومیه و نقده کاربرد جمعیت ماده‌زای گونه *T. embryophagum* به علت انتشار وسیع آن قابل توصیه است و همچنین با توجه به اینکه هر دو جمعیت ماده‌زا و دو جنسی در منطقه یافت می‌شوند تناوب ذکر شده را می‌توان در آن منطقه اعمال نمود. در آذربایجان شرقی و مازندران با توجه به غالب بودن گونه‌های نرزی دیگر، باید احتیاط‌های لازم را در رهاسازی جمعیت‌های ماده‌زا اعمال نمود. در صورت وجود جمعیت‌های ماده‌زای گونه‌های دیگر، می‌توان آنها را در مناطق خود به کار گرفت. چنین جمعیت‌هایی به ویژه در مودر گونه *T. dendrolimi* ممکن است یافت شوند. کاربرد گونه ماده‌زای *T. cacoeiciae* در منطقه یزد می‌تواند در رهاسازی انبوه علیه کرم گلوگاه انار مقرون به صرفه باشد، اما با توجه به غالب بودن گونه *T. brassicae* در آن منطقه، لازم است بررسی‌های صحرائی در این زمینه صورت گیرد.

نشانی نگارنده: دکتر ابراهیم ابراهیمی، بخش رده‌بندی حشرات، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران - ۱۹۳۹۵.