Archive of SID

نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۱ - ۳۲(۲): ۴۹-۶۹

ردیابی و شناسایی باکتری *Wolbachia* در زنبور *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae)

شهرام فرخی[۱و*]، مارتینوس اریس هویخنس[۲]، رسول زارع[۳] و پاتریک وربارشات[۲]

۱- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ۲- آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخنینگن، هلند، ۳- بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shahram.farrokhi@gmail.com

Detection of *Wolbachia* bacterium in Iranian strain of *Trichogramma brassicae* (Hym., Trichogrammatidae)

S. Farrokhi[1&*], M. E. Huigens[2], R. Zare[3] and P. Verbaarschot[2]

1. Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, 2. Laboratory of Entomology, Wageningen University, The Netherlands, 3. Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

*Corresponding author, E-mail: shahram.farrokhi@gmail.com

چکیده

باکتری‌های *Wolbachia* (α-proteobacteria) هم‌زیست‌های درون سلولی هستند که در بافت‌های تناسلی تعدادی از بندپایان یافت می‌شوند. القاء بکرماده‌زایی در زنبورهای تریکوگراما اغلب توسط این باکتری که از طریق سیتوپلاسم تخم منتقل می‌شود، صورت می‌گیرد. در این تحقیق، آلودگی به باکتری *Wolbachia* در ۴۹/۵، ۳/۶ و ۲/۵ درصد از افراد جمعیت‌های طبیعی زنبور *Trichogramma brassicae* Bezdenko که به‌ترتیب از بابلسر، چمستان و نور (استان مازندران) جمع‌آوری شده بودند با روش PCR و همسانه‌سازی ژن *wsp* مشاهده شد. توالی ژن *wsp* استرین باکتری مربوط به بابلسر تعیین و با کد FJ441291 و نام *w*Ba*T.bra* در بانک ژن جهانی (GenBank) به ثبت رسید. براساس درخت فیلوژنتیکی استرین‌های *Wolbachia* وابسته به زنبور تریکوگراما، هر دو استرین ایرانی *w*Ba*T.bra* و *Uro*3 به یک گروه (Sib) تعلق دارند. باتوجه به آلودگی درصد قابل توجهی از جمعیت زنبور *T. brassicae* بابلسر که گونه‌ی غالب در کشور محسوب می‌شود، مزیت‌های استفاده از لاین تک‌جنسی حاصل از این جمعیت در برنامه‌های کنترل بیولوژیک قابل ارزیابی می‌باشد.

واژگان کلیدی: PI-*Wolbachia*، زنبور تریکوگراما، ژن *wsp*، فیلوژنی، ماده‌زایی، کنترل بیولوژیک

Abstract

Wolbachia (α-proteobacteria) strains are intracellular endosymbiont bacteria found in reproductive tissues of many arthropod species. In *Trichogramma* wasps, thelytokous parthenogenesis is mostly induced by this bacterium which inherited transovarially. In this study, the *Wolbachia* infection was detected based on the PCR method and *wsp* gene cloning in 49.5, 3.6 and 2.5% of Baboulsar, Chamestan and Nour populations of *Trichogramma brassicae* Bezdenko collected from Mazandaran province. The Baboulsar bacterium strain is submitted to GenBank (FJ441291) under the name *w*Ba*T.bra*. The phylogenetic tree based on *wsp* sequences of *Wolbachia* strains in *Trichogramma* wasps indicates that the Iranian strains, *w*Ba*T.bra* and *Uro*3 belonged to the same group (Sib group). With regard to the high rate infection in Baboulsar population of *T. brassicae* as a dominant species in Iran, it will be possible to assess the potential advantages of its asexual line in biological control projects.

Key words: PI-*Wolbachia*, *Trichogramma* wasp, *wsp* gene, phylogeny, thelytoky, biological control

دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۹؛ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۷.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زنبورهای جنس *Trichogramma* Westwood با داشتن حدود ۱۸۰ گونه بزرگ‌ترین و شناخته‌شده‌ترین جنس از خانواده‌ی Trichogrammatidae می‌باشند که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک بال‌پولک‌داران خسارت‌زا از آن‌ها استفاده می‌شود (Pintureau, 1990; Smith, 1996; Hassan *et al.*, 1998; Pinto, 1998). طی سال‌های اخیر، به‌طور متوسط در بیش از ۱۰۰۰۰۰ هکتار از باغ‌ها و مزارع کشور رهاسازی تریکوگراما علیه آفات مختلف، به‌ویژه کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis* (Walker)، در شالیزارهای گیلان و مازندران انجام شده است (Ebrahimi, 1999). بررسی‌های فونستیک در ایران منجر به شناسایی و گزارش ۱۱ گونه زنبور تریکوگراما شده که در بین آن‌ها *Trichogramma brassicae* Bezdenko بیش‌ترین فراوانی و گسترش را داشته است (Shojai *et al.*, 1990; Ebrahimi, 1999).

در انتخاب سوش مناسب زنبور تریکوگراما برای استفاده در یک برنامه‌ی رهاسازی، عوامل کلیدی مختلف شامل پذیرش گیاه و حشره‌ی میزبان، تحمل شرایط محیطی، توانایی پارازیته کردن سنین مختلف میزبان و قدرت جستجوگری مطرح می‌باشند (Doutt, 1958; Trumble & Alvarado-Rodriguez, 1998). این ویژگی‌ها در سوش‌های بومی بیش‌تر مصداق دارند، به‌ویژه آنکه در شرایط مزرعه نیز دارای قدرت پارازیتیسم بالاتری هستند. درنتیجه، تازمانی‌که سوش‌های بومی زنبور تریکوگراما مناسب و کارآمد باشند به گونه‌های وارداتی ترجیح داده می‌شوند (Hassan, 1994). موفقیت پارازیتوئیدهای تخم در رهاسازی‌ها می‌تواند به نحوه‌ی تولید مثل آن‌ها نیز بستگی داشته باشد (Stouthamer, 1993; 2003). شیوه‌ی تولید مثلی متداول در تریکوگراما، نرزایی (arrhenotoky) است که نتاج نر از تخم‌های تلقیح نشده و نتاج ماده از تخم‌های بارور شده به‌وجود می‌آیند. روش تولید مثلی دیگری که در این زنبورها دیده می‌شود، ماده‌زایی (thelytoky) است که در زنبورهای ماده‌زا تخم‌های تلقیح نشده نیز به نتاج ماده تبدیل می‌شوند. درحدود ۱۰ درصد از گونه‌های تریکوگراما، آلودگی به باکتری *Wolbachia* گزارش شده است. این باکتری باعث القاء ماده‌زایی می‌شود (Pintureau *et al.*, 2002; Almeida, 2004). در زنبور تریکوگراما، این جمعیت‌های ماده‌زا می‌توانند از نظر کارایی مؤثرتر از نمونه‌های دوجنسی باشند که مزیت‌هایی به آن‌ها نسبت داده شده (Stouthamer, 1993; 2003)

www.SID.ir

Archive of SID

و در این راستا بررسی‌های مقایسه‌ای نیز صورت گرفته است (Farrokhi *et al.*, 2010; Silva, 1999).

باکتری‌های *Wolbachia* (α-proteobacteria) هم‌زیست درون سلولی تعدادی از بندپایان و نماتدهای فیلاریا می‌باشند که اغلب موجب تغییراتی در ویژگی‌های تولید مثلی آن‌ها می‌شوند (Taylor & Hoerauf, 1999; Werren, 1997). این عوامل میکروبی می‌توانند بسته به نوع میزبان تغییرات مختلفی را شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی[۱]، مؤنث‌سازی[۲]، نرکشی[۳] و القاء ماده‌زایی[٤] در شیوه‌ی تولید مثل آن‌ها موجب شوند (O'Neill *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999). همچنین، آن‌ها می‌توانند در برخی موارد باروری میزبان خود را به مقدار قابل توجهی افزایش دهند یا فاقد هرگونه اثر آشکاری باشند (Girin & Bouletreau, 1995; Vavre *et al.*, 1999). بررسی فیلوژنی استرین‌های این باکتری برمبنای ژن‌های 16S *rRNA*، *ftsZ* و به‌ویژه *wsp*[٥]، آن‌ها را به شش بالاگروه (A-F) تقسیم نموده که اعتبار بالاگروه‌های A و B به‌طور کامل مورد تأیید می‌باشد (Zhou *et al.*, 1998). براساس آخرین نتایج تحقیقاتی، یازدهمین بالاگروه (K) نیز معرفی شده است (Ros *et al.*, 2009).

در بین ۱۸ گونه زنبور *Trichogramma* که به‌عنوان میزبان PI-*Wolbachia* گزارش شده‌اند، آلودگی در دو گونه‌ی *T. cordubensis* Vargas & Cabello و *T. oleae* Voegelé & Pointel مربوط به استرین‌هایی از بالاگروه B می‌باشد، به‌نحوی‌که آلودگی در تمام افراد جمعیت وجود دارد (حالت همگانی یا fixed). آلودگی در سایر گونه‌ها که استرین‌هایی متعلق به هر دو بالاگروه A و B را شامل می‌شود، به‌صورت مختلط است (حالت mixed یا اختلاطی از افراد آلوده و غیرآلوده) و تنها در تعدادی از افراد جمعیت که دارای تراکم مناسبی از باکتری می‌باشند ماده‌زایی دیده می‌شود (Stouthamer, 1997). در ایران تنها یک مورد آلودگی به این باکتری (استرین *Uro*3) در زنبور *Trichogramma embryophagum* (Hartig) توسط Ebrahimi (2001) از ارومیه گزارش شده است. با بررسی وضعیت بکرزایی در ۱۱ سوش ایرانی زنبور *T. brassicae*

۱- Cytoplasmic incompatibility (CI)
۲- Feminization
۳- Male-killing
٤- Parthenogenesis inducing (PI)
٥- *Wolbachia* outer surface protein gene

www.SID.ir

Archive of SID

که توسط Attaran (2002) انجام شد، باوجود بالا بودن نسبت افراد ماده در برخی اکوتیپ‌ها، شواهدی دال بر آلودگی به باکتری عامل ماده‌زایی به‌دست نیامد.

در تحقیق حاضر تلاش شده است تا باتوجه به کاربرد به‌نسبت وسیع زنبور تریکوگراما در کشور و اهمیت اقتصادی استفاده از زنبورهای تک‌جنسی (unisexual)، ضمن بررسی شیوه‌ی تولید مثلی در اکوتیپ‌های بومی این زنبور، عامل ماده‌زایی در بین آن‌ها با روش‌های مولکولی ردیابی و شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و نگه‌داری اکوتیپ‌های زنبور تریکوگراما

برای دست‌یابی به نمونه‌های ماده‌زای زنبور، در سال‌های ۸۵-۱۳۸٤ تخم‌های پارازیته‌ی بال‌پولک‌داران از گیاهان مختلف شامل برنج و علف‌های هرز حاشیه‌ی شالیزارها، به‌ویژه گیاه مستک (توق) *Xanthium strumarium* L. (Asterales: Asteraceae)، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. بیش‌تر نمونه‌ها در اواسط شهریور ماه که برنج در بیش‌تر شالیزارها برداشت شده بود، از مناطق شمالی و مرکزی استان مازندران به‌دست آمدند. علاوه‌براین، برای دست‌یابی به افراد ماده‌زا، جستجو در بین نمونه‌های ارسالی از نقاط مختلف ایران و جمعیت‌های تک‌جنسی و دوجنسی زنبورهای تریکوگراما ادامه یافت. این زنبورها در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به‌صورت زنده نگه‌داری می‌شوند (جدول ۱).

پس از خروج زنبورها، هر یک از سوش‌ها به تفکیک در شرایط ۱°C ± ۲۰، رطوبت نسبی ۱۰ ± ٦۰ درصد و طول دوره‌ی روشنایی ۱٦ و تاریکی ۸ ساعت روی تخم بید غلات پرورش داده شدند. برای تعیین وضعیت بکرزایی و تولید مثل زنبورها، تخم‌های پارازیته به صورت انفرادی و مجزا در لوله‌های شیشه‌ای (۷۵ × ۱۲ میلی‌متر) قرار داده شدند. پس از خروج حشرات کامل نسل اول، تخم تازه‌ی میزبان واسط به‌طور جداگانه در اختیار زنبورهای ماده‌ی باکره (isofemale) گذاشته شد و در نهایت نسبت جنسی نتاج آن‌ها مشخص گردید. با مشاهده‌ی افراد ماده‌زا و دوجنسی در یک جمعیت، نسبت به ایجاد لاین‌های خالص و تداوم پرورش آن‌ها در همان شرایط محیطی اقدام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی زنبورها و ردیابی باکتری *Wolbachia*

برای شناسایی زنبورها علاوه بر تهیه‌ی اسلاید میکروسکوپی از شاخک و ژنیتالیای نر و استفاده از کلید مربوط به صفات مرفولوژیک (Ebrahimi *et al.*, 1998)، از روش مولکولی نیز برای تعیین اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS2[1] و مقایسه‌ی آن در نمونه‌های مختلف استفاده شد (Silva, 1999; Stouthamer *et al.*, 1999). در موارد مشکوک به آلودگی میکروبی که تمام نتاج زنبورهای باکره، ماده و یا ترکیبی از نر و ماده بودند (thelytoky یا deuterotoky) ابتدا زنبورهای ماده با محلول آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین هیدروکلراید به نسبت ۵۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر آب و عسل (Tagami *et al.*, 2002) تغذیه شدند و دوباره نحوه‌ی تولید مثل آن‌ها پس از چهار نسل بررسی شد. درصورت بازگشت به حالت دوجنسی احتمال آلودگی به باکتری القاءکننده‌ی بکرزایی زیاد بود که برای تأیید نهایی، ژن *wsp* به روش مولکولی و با استفاده از PCR[2] ردیابی و تعیین توالی شد (Pintureau *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2006).

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA نمونه‌های مورد نظر، طبق روش Huigens *et al.* (2004) انجام شد. در مواردی که هدف آزمایش ردیابی باکتری در یک جمعیت یا لاین مشخص بود، به‌جای یک زنبور از پنج زنبور ماده استفاده شد. به‌این ترتیب که ابتدا به هریک از لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری محتوی زنبور، ۵۰ میکرولیتر Chelex-100 پنج درصد و ٤ میکرولیتر Proteinase K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده شد. نمونه‌ها حداقل به مدت ٤ ساعت در انکوباتور ٥٦°C و متعاقب آن ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شدند و درنهایت تا پیش از انجام واکنش PCR نمونه‌ها در دمای ٤°C نگه‌داری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه Eppendorf thermocycler در لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA نمونه‌ی مورد نظر، ۵ میکرولیتر green PCR reaction buffer 5X (Promega, Madison, WI, USA)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (هر کدام با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای

۱- Internal transcribed spacer-2

۲- Polymerase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

forward و reverse با غلظت ۲۵ پیکومول بر میکرولیتر، ۰/۱۲۵ میکرولیتر *Go Taq polymerase* (۵ واحد بر میلی‌لیتر) (Promega, Madison, WI, USA) و ۱۱/۸۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. آغازگرهای ITS2 و *wsp* و برنامه‌ی مربوط به هریک از آن‌ها که به‌ترتیب برای شناسایی زنبور و باکتری استفاده شدند عبارتند از: 'ITS2-forward 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'، 'ITS2-reverse 5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3'، ۳ دقیقه در ۹٤°C، ۳۳ تکرار از ۹٤°C (٤۰ ثانیه)، ۵۳°C (٤۵ ثانیه)، ۷۲°C (٤۵ ثانیه) و در نهایت بعد از آخرین چرخه، ۱۰ دقیقه در ۷۲°C (Gonçalves *et al.*, 2006)؛ *wsp*-forward (*81F*) 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'، *wsp*-reverse (*691R*) 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'، ۳ دقیقه در ۹٤°C، ٤۰ تکرار از ۹٤°C (یک دقیقه)، ۵۰°C (یک دقیقه)، ۷۲°C (یک دقیقه) و در نهایت بعد از آخرین چرخه، ۵ دقیقه در ۷۲°C (Braig *et al.*, 1998). در نهایت پس از انجام الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های اصلی (جمعیت‌های مورد اشاره در شکل ۱) به همراه نمونه‌های استاندارد موجود در آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخنینگن و نشانگر نردبانی ۱۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید، از ژل‌های مربوطه عکس تهیه شد.

همسانه‌سازی (cloning) و تعیین توالی ژن‌های ITS2 و *wsp*

به‌منظور اطمینان از دقت در شناسایی زنبورهای مناطق بابلسر (جمعیت‌های آلوده و غیرآلوده)، فردوس و نوا، توالی ناحیه‌ی ITS2 پس از همسانه‌سازی در چهار نمونه تعیین شد. این عمل در مورد ژن *wsp* نیز برای بررسی فیلوژنی استرین باکتری همزیست وابسته به جمعیت آلوده‌ی بابلسر ($B\ 11W^{+}$) انجام شد. پس از انجام PCR و راندن نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز و برش قطعات ژل حاوی محصولات ITS2 و *wsp*، خالص‌سازی آن‌ها با کیت MinElute Gel Extraction (Qiagen) صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد، طبق دستورالعمل کیت CloneJet PCR Cloning (Fermentas) هریک از قطعات مورد نظر به تفکیک وارد یک حامل پلاسمیدی (pJET1.2/blunt plasmid vector) شدند. سپس پلاسمیدها به درون سلول‌های باکتری *Escherichia coli* x12 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) منتقل شده و باکتری‌ها روی محیط آب آگار و مخمر درون تشتک‌های پتری به قطر ۷ سانتی‌متر در دمای ۳۷°C به‌مدت ۱۲ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

کشت داده شدند. درنهایت، با استفاده از کیت Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich)، خالص‌سازی قطعات DNA مورد نظر صورت گرفت و پیش از ارسال آن‌ها برای تعیین توالی، با انجام PCR دوباره نمونه‌ها، از صحت الحاق قطعات ITS2 و *wsp* اطمینان حاصل شد.

بررسی فیلوژنتیک باکتری

برای تعیین فیلوژنی تنها استرین ایرانی باکتری *Wolbachia* که در این تحقیق توالی ژن *wsp* آن به‌دست آمد، از ٤٢ نمونه‌ی دیگر، متعلق به بندپایانی از سه قاره‌ی آسیا، اروپا و آمریکا شامل ۱۵ گونه زنبور تریکوگراما استفاده شد. باتوجه به امکان انتقال افقی این باکتری بین گونه‌های مختلف جانوری، انتخاب استرین‌های باکتری تنها برمبنای ارتباط تاکسونومیک میزبان صورت نگرفته است. توالی‌های به‌دست آمده در این تحقیق با نرم‌افزار GeneDoc مرتب شده و به‌روش pairwise alignment با تغییرات جزئی با یکدیگر تطبیق داده شدند. آنالیزهای فیلوژنتیک به‌روش maximum parsimony براساس تنظیم اولیه‌ی برنامه‌ی MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) انجام شدند. مبنای آنالیز در این شیوه، روش جستجوهای اکتشافی (heuristic searches) به‌همراه یک روش مرحله به مرحله بود و معدود فضاهای خالی، به‌عنوان داده‌های گم‌شده در نظر گرفته شدند. استرین مربوط به زنبور *Encarsia formosa* Gahan که به لحاظ نحوه‌ی القاء بکرزایی و پایداری آن در جمعیت میزبان خود از وضعیت موجود در زنبور تریکوگراما متمایز می‌باشد، به‌عنوان outgroup منظور شد. درجه‌ی اعتبار شاخه‌های درخت با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap محاسبه شد.

نتایج

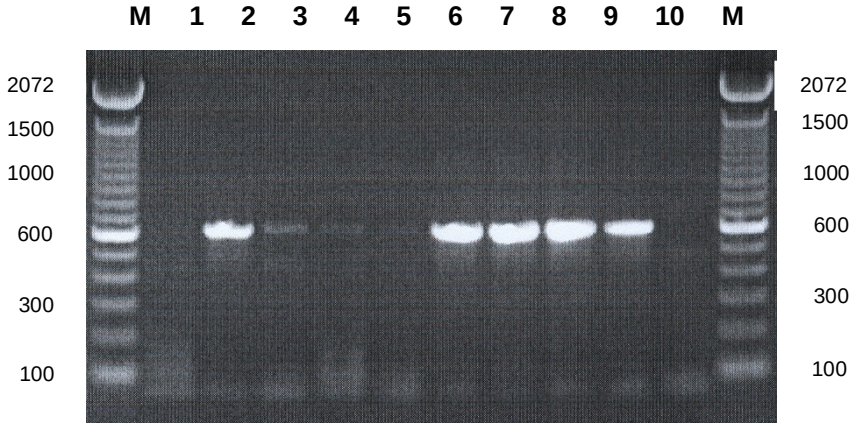
ردیابی باکتری *Wolbachia*

در بین ۲۲ سوش یا جمعیت مختلف زنبور تریکوگراما، علاوه‌بر جمعیت‌های تک‌جنسی فردوس (شمال‌غرب خراسان جنوبی) و نوا (مازندران) که به‌ترتیب از آفات کلیدی باغ‌های انار و سیب جمع‌آوری و تمام افراد آن‌ها ماده بودند، تنها در تک‌ماده‌های باکره‌ی سه جمعیت بابلسر، چمستان و نور بکرماده‌زایی (thelytokous parthenogenesis) با مقادیر متفاوت مشاهده شد. شیوه‌ی تولید مثلی در این سه جمعیت که روی گیاه مستک و تخم‌های پارازیته‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

ساقه‌خوار اروپایی ذرت جمع‌آوری شده بودند، بر اثر تغذیه‌ی زنبورها با عسل آغشته به آنتی‌بیوتیک یا پرورش آن‌ها در دمای ۳۰°C–۲۸ به حالت عادی بازگشت. با ردیابی باکتری *Wolbachia* در هفت نمونه از زنبورها و براساس نتایج بررسی‌های مولکولی، آلودگی باکتریایی در پنج جمعیت ماده‌زا و دوجنسی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱– محصول PCR ژن *wsp* در جمعیت‌های مختلف زنبور تریکوگراما: ۱، دوجنسی بابلسر (B 13)؛ ۲، ماده‌زای بابلسر ($B\ 11W^{+}$)؛ ۳، ماده‌زای تیمارشده با آنتی‌بیوتیک ($B\ 11W^{-}$)؛ ٤، نوا؛ ٥، فردوس؛ ٦، زهک؛ ۷، گوربند؛ ۸، بیله‌سوار؛ ۹، قلعه‌قاضی؛ ۱۰، شاهد منفی؛ M نشانگر نردبانی ۱۰۰ جفت باز.

Fig. 1. The *wsp* PCR products of *Trichogramma* populations: lane 1, Babolsar bisexual (B 13); lane 2, Babolsar thelytokous ($B\ 11W^{+}$); lane 3, cured line by antibiotic ($B\ 11W^{-}$); lane 4, Nava; lane 5, Ferdows; lane 6, Zehak; lane 7, Gourband; lane 8, Bilehsavar; lane 9, Ghalehghazi; lane 10, negative control; M, 100bp marker.

از مجموع بررسی‌ها و آزمایش‌های مختلف چنین نتیجه‌گیری می‌شود که عامل ماده‌زایی در ٤۹/٥، ۳/٦ و ۲/٥ درصد از افراد بررسی شده در جمعیت‌های بابلسر، چمستان و نور که براساس صفات مرفولوژیک *T. brassicae* تشخیص داده شدند، باکتریایی است. در جمعیت‌های تک‌جنسی فردوس و نوا که نشانه‌ای از وجود باکتری دیده نشد و با اعمال تیمارهای حرارتی

www.SID.ir

Archive of SID

و آنتی‌بیوتیکی نیز افراد نر ظاهر نشدند، ماده‌زایی دارای منشأ ژنتیکی است. در چهار جمعیت بیله‌سوار (شمال استان اردبیل)، قلعه‌قاضی، گوربند و زهک (استان‌های جنوب و جنوب شرقی) با وجود مثبت بودن نتیجه‌ی ردیابی باکتری *Wolbachia*، ماده‌زایی مشاهده نشد که علت آن می‌تواند به نوع استرین یا غلظت اولیه‌ی باکتری موجود در بدن زنبور مربوط باشد (جدول ۱). اما در اکوتیپ زهک حدود ۲٪ از ماده‌های باکره به حالت نر- ماده‌زایی (deuterotoky) نتاج نر و ماده تولید نمودند.

شناسایی زنبورها

شناسایی جمعیت‌های بابلسر، بیله‌سوار و زهک با روش مولکولی با نتایج مبتنی بر صفات مرفولوژیک مطابقت داشت که درنهایت نیز جمعیت‌های بابلسر و بیله‌سوار *T. brassicae* و زهک *Trichogramma pintoi* Voegelé معرفی شدند. تمایز جمعیت‌های قلعه‌قاضی و گوربند به‌دلیل تشابه مرفولوژیک *Trichogramma evanescens* Westwood و *T. brassicae*، برمبنای اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS2 صورت گرفت و هر دو نمونه *T. evanescens* تشخیص داده شدند. شناسایی اکوتیپ‌های تک‌جنسی فردوس و نوا به‌دلیل فقدان جنس نر تنها از طریق مقایسه‌ی اندازه‌ی محصول PCR و نتیجه‌ی تأثیر آنتی‌بیوتیک بر نحوه‌ی تولید مثل زنبورها امکان‌پذیر بود. به‌دلیل عدم آلودگی باکتریایی در این دو اکوتیپ، منشأ ماده‌زایی آن‌ها ژنتیکی تشخیص داده شد. باتوجه به اینکه ماده‌زایی ژنتیکی تنها در گونه‌ی *Trichogramma cacoeciae* Marchal گزارش شده بود (Vavre *et al*., 2004)، درابتدا چنین به‌نظر می‌رسید که هر دو اکوتیپ می‌باید متعلق به همین گونه باشند. اما براساس تفاوت نمونه‌های فردوس و نوا از نظر اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS2 و همچنین تعیین توالی و تطابق انجام شده با سایر نمونه‌های بانک ژن، اکوتیپ‌های فردوس و نوا به‌ترتیب *T. cacoeciae* و *T. embryophagum* تشخیص داده شدند.

تعیین توالی ژن‌های ITS2 و *wsp*

توالی ناحیه‌ی ITS2 در لاین‌های ماده‌زا (آلوده به *Wolbachia*) و دوجنسی جمعیت بابلسر (*T. brassicae*) که روی حشره و گیاه میزبان مشابهی در یک منطقه جمع‌آوری شده بودند،

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- جمعیت‌های بررسی‌شده‌ی زنبور *Trichogramma*، نوع بکرزایی و آلودگی آن‌ها به باکتری *Wolbachia*.

Table 1. The studied populations of *Trichogramma* wasps, their parthenogenesis and *Wolbachia*-infection.

Population	Host plant	Host (insect)	Initial sex ratio (female %)	Number of studied isofemale (virgin) wasps	Thelytokous isofemale (%)	Parthenogenesis result*	*Wolbachia* detection
Amol	Mastak[1]	*Ostrinia nubilalis*	54%	47	0	A	-
Gelyerd (Mazandaran)	Mastak	*O. nubilalis*	55%	65	0	A	-
Ejbarkola (Amol)	Rice	*Chilo suppressalis*	63%	17	0	A	-
Mahmudabad	Mastak	*O. nubilalis*	60%	25	0	A	-
Galeshpol (Mazandaran)	Mastak	*O. nubilalis*	59%	102	0	A	-
Babolsar	Mastak	*O. nubilalis*	74%	107	49.5%	A/T	P
Babol	Mastak	*O. nubilalis*	54%	11	0	A	-
Chamestan	Mastak	*O. nubilalis*	59%	28	3.6%	A/T	P
Nour	Mastak	*O. nubilalis*	63%	40	2.5%	A/T	P
Nava	Apple	*Cydia pomonella*	67-100%	30	100%	T/A	N
Ferdows (Khorasan)	Pomegranate	*Ectomyelois ceratoniae*	100%	30	100%	T	N
Gorgan	Cotton	*Helicoverpa armigera*	70%	20	0	A	-
Aliabad (Gorgan)	Cotton	*H. armigera*	61%	17	0	A	-
Shastkola (Gorgan)	Trap[2]	?*Sitotroga cerealella*	55%	16	0	A	-
Gonbad	Cotton	*H. armigera*	59%	16	0	A	-
Rasht (Insectarium)	?	?*Sitotroga cerealella*	77%	28	0	A	-
Bilehsavar	Cotton	*H. armigera*	72%	37	0	A	P
Moghan	Cotton	*H. armigera*	68%	29	0	A	-
Zehak (Zabol)	Panirak[3]	*Vanessa cardui*	65%	34	0	A/D	P
Ghalehghazi (Bandar-Abbas)	Panirak	*V. cardui*	49%	32	0	A	P
Gourband (Minab)	Panirak	*V. cardui*	64%	30	0	A	P
Bagh Malek (Khuzestan)	?	?	?	25	0	A	-

* Thelytoky/Arrhenotoky/Deuterotoky (T/A/D).
1- *Xanthium strumarium*; 2- *Sitotroga* egg; 3- *Malva neglecta*.
P = Positive; N = Negative.

نشان‌دهنده‌ی تشابه ژنتیکی بسیار زیاد آن‌ها می‌باشد. در مورد جمعیت‌های فردوس و نوا، همان‌طور که در قسمت قبلی اشاره شد، باوجود شباهت توالی ناحیه‌ی ITS2 این دو اکوتیپ، در بین ۵۷۶ باز، ۲۲ تفاوت نیز وجود داشت. با در نظر گرفتن تغییر سیستم تولید مثلی اکوتیپ

www.SID.ir

Archive of SID

نوا از حالت ماده‌زایی کامل (تک‌جنسی) به دوجنسی پس از چندین نسل پرورش در دماهای مختلف و همچنین تفاوت در اندازه‌ی محصول PCR ناحیه‌ی مزبور، این دو جمعیت مربوط به دو گونه‌ی متفاوت می‌باشند.

با تعیین توالی ژن *wsp* استرین باکتری *Wolbachia* که از زنبورهای ماده‌زای جمعیت بابلسر (*T. brassicae*) به‌دست آمده بود و مقایسه‌ی آن با سایر استرین‌های موجود در بانک ژن، شباهت بسیار زیادی بین استرین جدید ایرانی (*w*Ba$_{T.bra}$) و استرین ژاپنی (*WDen Fukuyama*) که از زنبور *Trichogramma dendrolimi* Matsumura گزارش شده مشاهده گردید، به‌نحوی‌که تفاوت آن‌ها تنها در ۳ باز بود (شکل ۲). توالی‌های مربوط به ژن *wsp* استرین ایرانی باکتری *Wolbachia* و ناحیه‌ی ITS2 زنبور *T. brassicae* آلوده به این باکتری با استفاده از برنامه‌ی Sequin به بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) ارائه و در نهایت با کدهای FJ441291 و FJ441292 به‌ترتیب برای استرین *w*Ba$_{T.bra}$ و زنبور میزبان آن (Tbra-B 11) به ثبت رسید.

فیلوژنی باکتری *Wolbachia*

همان‌طور که از نتایج به‌دست آمده از تشکیل درخت فیلوژنی باکتری *Wolbachia* مشاهده می‌شود (شکل ۳)، استرین *w*Ba$_{T.bra}$ (که در این بررسی از *T. brassicae* بابلسر شناسایی شد) به همراه دیگر استرین ایرانی *Uro*3 (*T. embryophagum*، ارومیه) در گروه Sib از بالاگروه B قرار گرفتند. استرین‌های AB094397 (*WDen Fukuyama*) و AY634680 مربوط به گونه‌ی *T. dendrolimi* و EU181443 وابسته به زنبور *Chouioia cunea* Yang (Hym.: Eulophidae) (پارازیت شفیره‌ی پروانه‌ی تارتن پائیزی، *Hyphantria cunea* (Drury)، در چین) بیش‌ترین قرابت را با استرین *w*Ba$_{T.bra}$ دارند (شکل‌های ۲ و ۳). سایر استرین‌های وابسته به زنبور *T. brassicae* که از فرانسه، آلمان و چین گزارش شده‌اند در دو گروه دیگر (Chi و Kue) از بالاگروه‌های B و A قرار دارند. شاخص‌های محاسبه‌شده، مثل CI = ۰/۶۱۳۷، نشان از پایداری درخت ترسیم شده دارد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

```
wBa     1  TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAACTAGCTACTACGTTCGTTTACAATACAACGGTGAAAT   60
WDen    1  TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAACTAGCTACTACGTTCGTTTACAATACAACGGTGAAAT   60

wBa    61  TTTACCTTTTTTATACAAAAGTTGATGGTATTAAAAATTCAACAGGTAAAGAGGAGGATAG  120
WDen   61  TTTACCTTTTTTATACAAAAGTTGATGGTATTAAAAATTCAACAAGTAAAGAGGAGGATAG  120

wBa   121  TCCTTTAAAAAGATCTTTTATAGCTGGTGGTTTTGCATTTGGTTATAAAATGGATGACAT  180
WDen  121  TCCTTTAAAAAGATCTTTTATAGCTGGGGGTGTTGCATTTGGTTATAAAATGGATGACAT  180

wBa   181  CAGAGTTGATGTTGAAGGGCTTTACTCACGATTGGCTAAAAATAAAGCTGTAATAGATGC  240
WDen  181  CAGAGTTGATGTTGAAGGGCTTTACTCACGATTGGCTAAAAATAAAGCTGTAATAGATGC  240

wBa   241  TTCTGAATCACATGTTGCAGACAGTTTAACAGCATTTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTA  300
WDen  241  TTCTGAATCACATGTTGCAGACAGTTTAACAGCATTTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTA  300

wBa   301  TGATATAGTGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTTGGTGTTGGTGCAGC  360
WDen  301  TGATATAGTGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTTGGTGTTGGTGCAGC  360

wBa   361  ATATATCAGCAATCCTTCAAACGCTGCTGAAGTTAAAGATCAAAGGAGGTTCGGTTTTGC  420
WDen  361  ATATATCAGCAATCCTTCAAACGCTGCTGAAGTTAAAGATCAAAGGAGGTTCGGTTTTGC  420

wBa   421  TTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAGCCCCAGAAATCAAACTCTTTGCTGG  480
WDen  421  TTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAGCCCCAGAAATCAAACTCTTTGCTGG  480

wBa   481  AGCTCGTTACTTCGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGG  540
WDen  481  AGCTCGTTACTTCGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGG  540

wBa   541  TATCAAAAATGTTCTTTACAACACTTTTGGTGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTTTT   599
WDen  541  TATCAAAAATGTTCTTTACAACACTTTTGGTGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTTTT   599
```

شکل ۲- توالی‌های ژن *wsp* باکتری *Wolbachia* در استرین‌های $wBa_{T.bra}$ (مربوط به سوش *T. brassicae* بابلسر، ایران) و *WDen* (مربوط به سوش *T. dendrolimi* فوکویاما، ژاپن AB094397). حروف ضخیم موارد اختلاف را نشان می‌دهد.

Fig. 2. The *wsp* sequences: *w*Ba, *Wolbachia* strain of *T. brassicae* (Baboulsar, Iran); *WDen*, *Wolbachia* strain of *T. dendrolimi* (AB094397, Fukuyama, Japan). Bold letters indicate the differences.

بحث

براساس نتایجی که از ردیابی باکتری *Wolbachia* به‌عنوان مهم‌ترین عامل ماده‌زایی در زنبورهای تریکوگراما به‌دست آمد (جدول ۱)، می‌توان اظهار نمود که دست‌یابی به استرین‌های جدیدی که القاء بکرزایی (PI) توسط آن‌ها محرز شده باشد، به بررسی دقیق و گسترده‌ای نیاز دارد و احتمال می‌رود ردیابی آن در بین تمام گونه‌های موجود و در همه‌ی مناطق امکان‌پذیر نباشد. باوجودی‌که تعداد و پراکنش نمونه‌های بررسی شده نمی‌تواند شاخص دقیقی از کل

www.SID.ir

Archive of SID

کشور باشد، اما تاکنون از ۱۱ گونه‌ی شناخته شده در ایران، باکتری مزبور در دو گونه‌ی *T. embryophagum* از ارومیه و *T. brassicae* از بابلسر گزارش شده است. در دنیا نیز این نوع باکتری (PI-*Wolbachia*) به‌عنوان عامل القاءکننده‌ی ماده‌زایی درحدود ۱۰٪ از گونه‌های تریکوگراما مطرح شده است (Huigens & Stouthamer, 2003). پیش‌ازاین، از آسیا تنها یک گزارش از کشور چین در مورد آلودگی زنبور *T. brassicae* به‌عنوان گونه‌ای که تولید انبوه آن به‌صورت تجاری در سطح گسترده‌ای از کشورها مطرح می‌باشد، وجود داشته (بانک اطلاعاتی www.wolbachia.sols.uq.edu.au) که با مشخص‌شدن آلودگی درصد قابل ملاحظه‌ای (۴۹/۵٪) از جمعیت بابلسر می‌توان با انجام تحقیقات مقایسه‌ای و هدفمند جنبه‌های کاربردی استفاده از لاین‌های تک‌جنسی *T. brassicae* را، به‌ویژه علیه ساقه‌خوارهای برنج و ذرت، مورد بررسی قرار داد. دراین ارتباط تحقیقاتی در زمینه‌ی مقایسه‌ی برخی از ویژگی‌های زیستی جمعیت‌های دوجنسی و ماده‌زای این گونه (Farrokhi *et al.*, 2010) و امکان انتقال افقی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای این باکتری همزیست انجام شده (Farrokhi *et al.*, 2008) و مطالعات تکمیلی در سطح مزرعه در حال انجام است.

براساس درخت فیلوژنی استرین‌های *Wolbachia* همزیست زنبورهای تریکوگراما و تعداد دیگری از بندپایان (شکل۳)، استرین *w*Ba$_{T.bra}$ با استرین‌های عامل ماده‌زایی در جمعیت‌های *T. cordubensis* و *T. oleae* (*Grey* و *S2*) در یک گروه قرار دارد که آلودگی آن‌ها به حالت همگانی و تثبیت‌شده (fixed) است. این موضوع با در نظر گرفتن میزان شیوع و گسترش آلودگی طبیعی در جمعیت بابلسر می‌تواند بیانگر پتانسیل بالای این استرین در ایجاد و تثبیت ماده‌زایی در تمام افراد لاین تک‌جنسی حاصل از آن باشد، به‌نحوی‌که براساس گفته‌ی Huigens & Stouthamer (2003)، کم‌ترین هزینه‌ی سازگاری (fitness cost) را نیز برای میزبان خود خواهد داشت. باتوجه به اینکه در شرایط طبیعی امکان انتقال افقی باکتری از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر بر اثر سوپرپارازیتیسم و مولتی‌پارازیتیسم وجود دارد، نمی‌توان ارتباط دقیقی میان استرین‌های باکتری با میزبان و یا پراکنش جغرافیایی آن‌ها برقرار نمود. اما همان‌طور که اشاره شد از جنبه‌ی کاربردی شاید بتوان آلودگی به استرین *w*Ba$_{T.bra}$ را در درصد قابل توجهی از افراد جمعیت بابلسر (۴۹/۵٪)، با هم‌گروهی و تشابه ژنتیکی این باکتری با استرین‌های *Grey* و

www.SID.ir

Archive of SID

S2 مرتبط دانست. زیرا در اغلب جمعیت‌هایی که آلودگی آن‌ها به حالت mixed می‌باشد فراوانی افراد آلوده کم‌تر از ۵٪ است (Stouthamer, 1989; Stouthamer & Kazmer, 1994; Stouthamer *et al*., 2001) و یا درنهایت هم آلودگی به ۲۶٪ از افراد می‌رسد (Miura *et al*., 2009). برای اظهار نظر قطعی در این زمینه، در بررسی‌های تکمیلی استفاده از سیستم MLST[1] که ابزار مناسبی برای مطالعات تکاملی و ژنتیک جمعیت می‌باشد (Baldo *et al*., 2006) می‌تواند به تفسیر بهتر نتایج کمک نماید.

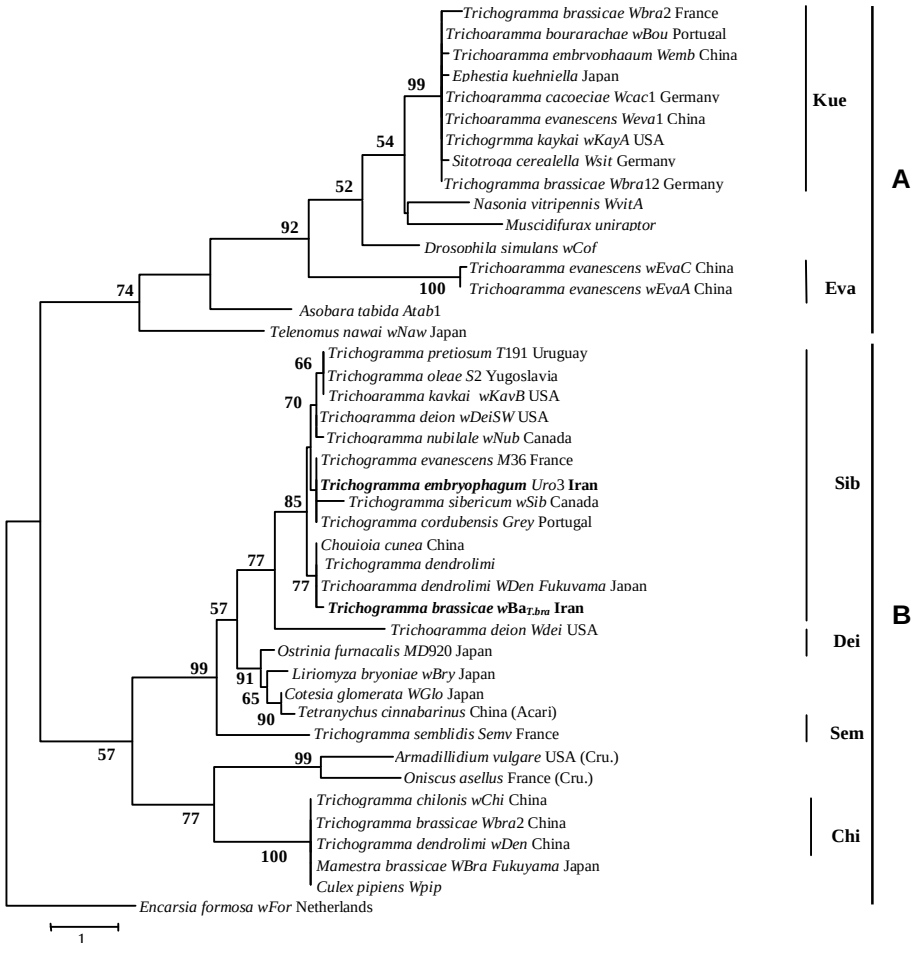
با در نظر گرفتن نتایج این بررسی و مواردی که از وجود باکتری در مناطق کم‌ارتفاع و حتی گرمسیر مانند حاشیه‌ی دریای خزر و استان‌های جنوب شرقی کشور به‌دست آمد، چنین برداشت می‌شود که باوجود تأثیر منفی گرما بر تراکم و قدرت ازدیاد باکتری *Wolbachia*، امکان دست‌یابی به استرین‌های جدیدی از این باکتری در میکروکلیماهای خاصی از مناطق کم‌ارتفاع و هم‌سطح دریا نیز وجود دارد. بر این اساس، ضمن در نظر گرفتن نتیجه‌گیری Monje *et al*. (2005) که در مناطق مرتفع (۱۱۰۰ تا ۳۷۰۰ متر از سطح دریا) مرکزی اکوادور رابطه‌ی مثبتی بین ارتفاع و فراوانی استرین‌های ماده‌زا به‌دست آوردند، نباید برای یافتن استرین‌های جدید *Wolbachia* هیچ منطقه یا اقلیمی را از نظر دور داشت، به‌طوری‌که جمعیت‌هایی از *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer و *T. deion* Pinto & Oatman که آلودگی باکتریایی در تعدادی از افراد آن به صورت مختلط وجود داشته از صحرای موجاوه در جنوب غربی آمریکا جمع‌آوری شده‌اند (Stouthamer, 1997; Stouthamer *et al*., 2001).

در مورد تفاوت‌های بین دو جمعیت فردوس و نوا می‌توان ماده‌زایی در چندین نسل از جمعیت نوا را به خالص‌نبودن جمعیت زنبور و هیبریداسیون ناشی از آن نسبت داد که Stouthamer *et al*. (1990) به مواردی از این پدیده در سوش‌های معینی از گونه‌های منطقه‌ی پاله‌آرکتیک مانند *T. cacoeciae* و *T. embryophagum* اشاره نموده‌اند. اما به هر حال با توجه به تشابه ظاهری و حتی ژنتیکی این دو گونه، برای اظهار نظر قطعی لازم است تحقیقات بیش‌تری در این زمینه صورت گیرد.

۱- Multilocus sequence typing

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی که براساس توالی‌های ژن *wsp* استرین‌های باکتری *Wolbachia* به روش maximum parsimony ساخته شده است. اسامی مربوط به گونه‌ی میزبان، استرین باکتری و محل جمع‌آوری نمونه‌ها است. اعداد مجاور محل انشقاق بیانگر درجه‌ی اعتبار bootstrap در ۱۰۰۰ تکرار می‌باشند. Consistency index (CI) = ۰/۶۱۳۷، Retention index (RI) = ۰/۸۸۱۷، Tree length = ۳۳٤.

Fig. 3. Phylogenetic tree based on *wsp* sequences of *Wolbachia*, constructed from a maximum parsimony analysis. Names correspond to source of strains. Numbers near the nodes indicate percentages of 1000 bootstrap replicates. Consistency index (CI) = 0.6137, Retention index (RI) = 0.8817, Tree length = 334.

www.SID.ir

Archive of SID

از تشابه ژنتیکی لاین‌های دوجنسی و ماده‌زای آلوده به باکتری جمعیت بابلسر (*T. brassicae*) چنین برداشت می‌شود که اختلاف جزئی در ناحیه‌ی ITS2 مربوط به تفاوت‌های فردی است و نمی‌توان آن را به اختلاف در سطوح بالاتر نسبت داد. طبق نظر Mayr *et al.* (1953)، گونه‌های هم‌جا (sympatric) که جدایی تولید مثلی نداشته و روی یک میزبان زندگی می‌کنند فاقد اختلاف ژنتیکی می‌باشند (به نقل از Steiner (1994)). بر این اساس، افراد ماده‌زا و دوجنسی که در تحقیق حاضر از دو دسته تخم پارازیته‌ی ساقه‌خوار اروپایی و روی دو بوته‌ی مستک و تقریباً نزدیک به‌هم (۱۰ الی ۱۰۰ متر) جمع‌آوری شده‌اند، نمی‌توانند بیوتیپ‌های گونه‌ی *T. brassicae* محسوب شوند. ضمن اینکه تمام زنبورهای خارج شده از یک دسته تخم، ماده‌زا نبوده و در کنار آن‌ها افراد دوجنسی غیرآلوده نیز در جمعیت وجود داشته است. لذا بهتر است با در نظر گرفتن تأثیر آنتی‌بیوتیک بر طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌های موجود در بدن زنبورهای تریکوگراما، در مقایسه‌ی ویژگی‌های زیستی افراد تک‌جنسی و دوجنسی علاوه‌بر افراد تیمار شده با آنتی‌بیوتیک (لاین دوجنسی حاصل از جمعیت آلوده به باکتری)، درصورت امکان از افراد دوجنسی طبیعی نیز استفاده شود تا علاوه‌بر کاستن از خطای آزمایش، بر دقت و اعتبار نتایج آن افزوده گردد.

در جمعیت‌های بیله‌سوار (*T. brassicae*)، زهک (*T. pintoi*)، قلعه‌قاضی و گوربند (*T. evanescens*) باوجود مثبت بودن نتیجه‌ی ردیابی باکتری *Wolbachia*، شیوه‌ی تولید مثلی به صورت دوجنسی یا نرزایی بود. مشابه این وضعیت را Song & Shen (2006) در چهار گونه‌ی غالب در چین، *T. dendrolimi*، *T. chilonis* Ishii، *T. evanescens* و *T. ostriniae* Pang & Chen، گزارش نموده و علت آن را به یک نوع مکانیزم جدید و یا پائین بودن غلظت باکتری نسبت داده‌اند. برای تعیین علت دقیق این پدیده بررسی‌های تکمیلی ضروری می‌باشد.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله ضمن قدردانی از مهندس محمود حسن‌زاده، مهندس رجب شکری و سایر عزیزانی که در جمع‌آوری، تهیه و ارسال نمونه‌ها همکاری نمودند، از دکتر محمدرضا عطاران و دکتر ابراهیم ابراهیمی به‌دلیل در اختیار گذاشتن نمونه‌های زنبور و شناسایی اولیه‌ی آن‌ها،
www.SID.ir

Archive of SID

صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخنینگن هلند به انجام رسیده است.

منابع

Almeida, R. P. (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.

Attaran, M. R. (2002) Evaluation of biological attribution of local ecotypes of *Trichogramma brassicae* Bezd. (Hym., Trichogrammatidae) in central and eastern costal regions of Caspian sea. Ph. D. Thesis. Islamic Azad University, Iran, 184 pp. [In Persian with English summary].

Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H. & Werren, J. H. (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11), 7098-7110.

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.

Doutt, R. D. (1958) The biology of parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 4, 161-182.

Ebrahimi, E. (1999) Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. Ph. D. Thesis. Tarbiat Modarres University, Iran, 149 pp. [In Persian with English summary].

Ebrahimi, E. (2001) Study on the effect of *Wolbachia* on thelytoky of an Iranian strain of *Trichogramma*. *Applied Entomology and Phytopathology* 68, 99-105. [In Persian with English summary].

Ebrahimi, E., Pintureau, B. & Shojai, M. (1998) Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. *Applied Entomology and Phytopathology* 66, 122-141. [In Persian with English summary].

Farrokhi, S., Ashouri, A., Huigens, M. E. & Verbaarschot, P. (2008) Horizontal transmission of *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps (Hym., Trichogrammatidae).
www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Plant Protection Science 41(2), 315-325. [In Persian with English summary].

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.

Girin, C. & Bouletreau, M. (1995) Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp *Trichogramma bourarachae*. *Experientia* 52, 398-402.

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. (1994) Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. pp. 55-71 in Wajnberg, E. & Hassan, S. A. (Eds) *Biological control with egg parasitoids*. 304 pp. CAB International, Wallingford, UK.

Hassan, S. A., Hafes, B., Degrande P. E. & Herai, K. (1998) The side-effects of pesticides on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae), acute dose-response and persistence tests. *Journal of Applied Entomology* 122, 569-573.

Huigens, M. E., Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F. & Stouthamer, R. (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London B* 271, 509-515.

Huigens, M. E. & Stouthamer, R. (2003) Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. pp. 247-266 in Bourtzis, K. & Miller, T. A. (Eds) *Insect symbiosis*. 347 pp. CRC Press.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.

Miura, K., Yamanaka, T., Suzuki, Y., Tagami, Y. & Davis, A. P. (2009) Male rescue maintains low frequency parthenogenesis-inducing *Wolbachia* infection in *Trichogramma* populations. *Population Ecology* 51, 245-252.

Monje, J. C., Ponce, F. & Zebites, C. P. W. (2005) Widespread occurrence of a thelytokous population of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in

www.SID.ir

Archive of SID

the highlands of Ecuador with notes on other indigenous egg parasitoids. *Entomologentagung 2005, Dresden* 114.

O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A. & Werren, J. H. (1997) *Influential passengers*: *inherited microorganisms and arthropod reproduction*. 232 pp. Oxford University Press, Oxford.

Pinto, J. D. (1998) Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 22, 1-287.

Pintureau, B. (1990) Polymorphisme, biogéographie et spécificité parasitaire des trichogrammes européens. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 95, 17-38.

Pintureau, B., Grenier, S., Heddi, A. & Charles, H. (2002) Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annales de la Société Entomologique de France* (*n.s.*) 38(4), 333-338.

Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J. & Breeuwer, J. A. J. (2009) How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* 75(4), 1036-1043.

Shojai, M., Tergari, S., Azma, M. & Nasrollahi, A. A. (1990) Faunistic study of beneficial parasitoid wasps *Trichogramma* and prospect for their application in agricultural field in Iran. *Iranian Research Organization for Science and Technology*, 33-47. [In Persian with English Summary].

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.

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

Song, Y. & Shen, Z. R. (2006) Distribution of *Wolbachia* in major *Trichogramma* wasps in China and their impacts on reproduction of the hosts. Available on: *http://www.ipmist.org/MemberDetails.aspx?PhotoID=103* (accessed August 2011).

Steiner, W. W. M. (1994) Genetics and insect biotypes: evolutionary and practical implications. pp. 1-18 in Narang, S. K., Bartlett, A. C. & Faust, R. M. (Eds) *Applications of genetics to arthropods of biological control significance.* 199 pp. CRC Press.

www.SID.ir

Archive of SID

Stouthamer, R. (1989) Causes of thelytoky and crossing incompatibility in several *Trichogramma* species. Ph. D. Thesis. University of California, Riverside, CA.

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

Stouthamer, R. (1997) *Wolbachia*-induced parthenogenesis. pp. 102-124 in O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A. & Werren, J. H. (Eds) *Influential passengers*: *inherited microorganisms and arthropod reproduction*. 232 pp. Oxford University Press, Oxford.

Stouthamer, R. (2003) The use of unisexual wasps in biological control. pp. 93-113 in van Lenteren, J. C. (Ed.) *Quality control and production of biological control agents*: *theory and testing procedures*. 327 pp. CABI Publishing, Wallingford.

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. & Kazmer, D. J. (1994) Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73, 317-327.

Stouthamer, R., Pinto, J. D., Platner, G. R. & Luck, R. F. (1990) Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma*. *Annals of the Entomological Society of America* 83, 475-481.

Stouthamer, R., van Tilborg, M., de Jong, H., Nunney, L. & Luck, R. F. (2001) Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London B* 268, 617-622.

Tagami, Y., Miura, K. & Stouthamer, R. (2002) Positive effect of fertilization on the survival rate of immature stages in a *Wolbachia*-associated thelytokous line of *Trichogramma deion* and *T. kaykai*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 105, 165-167.

Taylor, M. J. & Hoerauf, A. (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology Today* 15, 437-442.

Trumble, J. T. & Alvarado-Rodriguez, B. (1998) Trichogrammatid egg parasitoids in the management of vegetable-crop insect pests. pp. 158-184 in Ridgway, R. L., Hoffmann, M. P., Inscoe M. N. & Glenister, C. S. (Eds) *Mass-reared natural enemies*: *application, regulation, and needs*. 332 pp. Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, Lanham, MD, USA.

www.SID.ir

Archive of SID

Vavre, F., de Jong, J. H. & Stouthamer R. (2004) Cytogenetic mechanism and genetic consequences of thelytoky in the wasp *Trichogramma cacoeciae*. *Heredity* 93, 592-596.

Vavre, F., Girin, C. & Bouletreau, M. (1999) Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Molecular Biology* 8, 67-72.

Werren, J. H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Review Entomology* 42, 587-609.

Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S. (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London B* 265, 509-515.

www.SID.ir