

بررسی اثر مادری دما بر القای دیاپوز در زنبور پارازیتوید *Trichogramma brassicae* غیر آلوده و آلوده به باکتری *Wolbachia*

سمیه رحیمی کلدۀ^۱، احمد عاشوری^{۱*}، علیرضا بندانی^۱ و سید علی مدرس حسنی^۱

۱- بخش حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۱)

چکیده

در این تحقیق اثر مادری دما بر عنوان یک عامل اکولوژیک محیطی و نیز اثر آلودگی به ولباخیا به عنوان یک عامل ژنتیکی-درونی بر درصد دیاپوز زنبور پارازیتوید *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hym.: Trichogrammatidae) مورد مطالعه قرار گرفت. نسل مادری دو جمعیت آلوده به باکتری ولباخیا (تک‌جنسی) و غیر آلوده (دوجنسی) *T. brassicae* در دو دمای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس به صورت جداگانه پرورش یافت. یک روز پس از اوج خروج حشرات کامل نسل مادری، ۴۰ زنبور ماده تک‌جنسی و ۴۰ زنبور ماده دوجنسی جفت‌گیری کرده (هر دو یک‌روزه و آماده تخم‌گذاری) به‌طور جداگانه در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای قرار داده شدند. کارت‌های مقوایی حاوی ۱۰۰ عدد تخم میزبان شش ساعته، *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae)، در اختیار ماده‌های تخم‌گذار تا زمان مرگ آن‌ها قرار داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، آلودگی به ولباخیا و دمای پرورش نسل مادری دارای اثر معنی‌دار بر درصد دیاپوز بود، به طوری که افزایش دمای پرورش نسل مادری (دمای ۲۰ درجه سلسیوس) منجر به افزایش درصد دیاپوز در مقایسه با دمای پایین‌تر (۱۴ درجه سلسیوس) شد. درصد دیاپوز در جمعیت دوجنسی بیش از جمعیت تک‌جنسی بود که این امر نشان‌دهنده اثر منفی آلودگی به ولباخیا بر درصد دیاپوز این پارازیتوید است. احتمالاً حضور باکتری ولباخیا سبب از بین رفتن قسمتی از انرژی مورد نیاز جهت مقاومت زنبور پارازیتوید در برابر دمای پایین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پارازیتوید، دما، دیاپوز، *Wolbachia*، *Trichogramma brassicae*

مقدمه

زنبورهای پارازیتوئید جنس *Trichogramma* نه تنها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بسیاری از آفات کلیدی راسته بالپولکداران بلکه به عنوان مدلی مناسب، در مطالعات اکولوژیکی و فیزیولوژیکی مورد توجه بسیاری از محققان در سراسر جهان هستند (Smith, 1996). دیپوز در مرحله پیش‌شغیرگی یکی از مهم‌ترین نشانه‌های تنظیم رشد فصلی و تأمین‌کننده بقای این زنبورها است (Boivin, 1994). از آنجاکه زنبورهای پارازیتوئید این جنس، از پرکاربردترین عوامل کنترل بیولوژیک حشرات آفت هستند، داشتن هر گونه اطلاعاتی در مورد شرایط القاکننده یا بازدارنده دیپوز در این زنبورها می‌تواند دارای ارزش کاربردی زیادی باشد (Boivin, 1994).

دما ی حاکم بر مرحله جنینی و لاروی نسل دیپوز‌گذران مهم‌ترین عامل القای دیپوز در زنبورهای پارازیتوئید جنس تریکوگراما است. دما یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی تأثیرگذار روی رشد و نمو، رفتار و فیزیولوژی حشرات است (Jarosik et al., 2011; Denlinger et al., 2012). عامل دیگر، طول دوره نوری حاکم بر شفیره‌ها و حشرات کامل نسل مادری است (Reznik et al., 2011). دما و طول دوره نوری هر دو از عوامل اکولوژیک مؤثر بر القای دیپوز هستند که بیشترین تمرکز نیز تاکنون بر بررسی اثر همین عوامل اکولوژیک بر دیپوز زنبورهای جنس *Trichogramma* بوده است. اگرچه اثر مادری طول دوره نوری نسبت به اثر مستقیم دمای پایین، از اهمیت کمتری در القای دیپوز در زنبورهای پارازیتوئید جنس تریکوگراما برخوردار است (Sorokina and Maslennikova, 1987; Laing and Corrigan, 1995).

دما همچون طول دوره نوری دارای اثر مادری در القای دیپوز است. اثر مادری دما نسبت به طول دوره نوری ضعیف‌تر بوده و کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Saunders et al., 2002; Tachibana and Numata, 2004; Fukumoto et al., 2006; Reznik et al., 2008; Shintani and Higuchi, 2008). قرارگیری در

طول روز کوتاه در مناطق معتدله سبب القای دیپوز در یکسری از حشرات می‌شود، در این گروه از حشرات دمای پایین سبب القای دیپوز و دمای بالا سبب ممانعت از ورود به دیپوز می‌شود (Tauber et al., 1986; Chernysh, 1995). بنابراین دو عامل روز کوتاهی و دمای پایین دارای اثر تشدیدکنندگی در القای دیپوز هستند.

مطالعه همه جانبه دیپوز در زنبورهای جنس *Trichogramma* می‌تواند کمک شایانی در اقتصادی کردن پرورش انبوه این حشرات مفید داشته باشد. یکی دیگر از نکات مهم در تولید انبوه زنبورهای این جنس، انتخاب مؤثرترین گونه یا جمعیت است که از اهمیت به سزایی در میزان موفقیت کنترل بیولوژیک آفات با این گروه از پارازیتوئیدها برخوردار است (Smith, 1996). زنبور *T. brassicae* گونه غالب جنس تریکوگراما در ایران است (Ebrahimi et al., 1998) که در این مطالعه به عنوان گونه مدل مورد استفاده قرار گرفته است. این گونه همانند اغلب گونه‌های این جنس، دارای دو سیستم تولیدمثلی معجزا، هاپلودیپلوئید^۱ (دوجنسی) و ماده‌زا^۲ (تک-جنسی) است. آلودگی به یک باکتری همزیست درونی به نام *Wolbachia* منجر به تولید زنبورهای ماده‌زا در این گونه شده است، این باکتری به افراد ماده این امکان را می‌دهد تا از تخم‌های تلقیح نشده و غیربارور، نتاج ماده تولید کنند (Farrokhi et al., 2010). این باکتری‌ها عامل تعدادی از تغییرات تولیدمثلی شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی بین استرین‌ها و گونه‌های مرتبط، تلقیح بکرزایی، کشتن نرها و مونث‌سازی ژنتیکی نرها در میزبان‌هایشان هستند (Hurst et al., 2000). تغییرات تولیدمثلی میزبان، باعث پراکنش بیشتر باکتری در محیط می‌شود. زنبورهای تریکوگرامای آلوده به *Wolbachia* دارای دو مزیت نسبی در مقایسه با زنبورهای غیرآلوده هستند، اول، تولید زنبورهای ماده‌زا، به دلیل تولید نتاج ماده ارزان‌تر است و دوم، استقرار زنبورهای ماده‌زا در برنامه‌های کنترل بیولوژیک کلاسیک راحت‌تر صورت می‌گیرد

1. Arrhenotokous

2. Thelytokous

در این تحقیق از دو جمعیت آزمایشگاهی *T. brassicae* (دارای دو سیستم تولیدمثلی متفاوت، هاپلودیپلوئید و ماده‌زا) موجود در آزمایشگاه اکولوژی و رفتارشناسی دانشگاه تهران استفاده شد. هر دو جمعیت از مزارع ذرت استان مازندران (جنوب دریاچه خزر) جمع‌آوری شد. هر دو جمعیت مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی، دمای 1 ± 20 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 5 ± 70 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی روی تخم‌های شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* برای بیش از ۱۰۰ نسل پرورش یافتند. جهت ایجاد بیشترین تشابه ژنتیکی از نتاج مربوط به یک ماده اولیه استفاده شد. به منظور ایجاد کلنی اولیه، یک کارت مقوایی به ابعاد 1×5 سانتی‌متر حاوی ۵۰ عدد تخم میزبان ۲۴ ساعته به‌طور جداگانه در اختیار یک زنبور ماده جفت‌گیری کرده دوجنسی (غیرآلوده) و یک زنبور ماده تک‌جنسی (آلوده) قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت زنبورهای تخم‌گذار حذف و کارت‌های مقوایی به‌طور جداگانه درون لوله‌های آزمایش تا زمان خروج حشرات کامل نسل جدید، در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شد. به منظور اطمینان از ماده‌زا بودن زنبورهای تک‌جنسی، جنسیت نتاج مورد بررسی قرار گرفت.

پرورش آزمایشگاهی *E. kuehniella*

در این پژوهش از بیدآرد *E. kuehniella* به‌عنوان میزبان آزمایشگاهی استفاده شد. برای پرورش میزبان، میزان $1/3$ گرم تخم بیدآرد به ظروف مستطیلی شکل به ابعاد $10 \times 16 \times 23$ سانتی‌متر محتوی یک کیلوگرم آرد سبوس‌دار همراه با مخمر که به منظور تهویه، درپوش آن‌ها با منفذی به ابعاد 7×14 سانتی‌متر ایجاد و با توری مسدود شده بود، اضافه شد. پرورش در دمای 1 ± 25 درجه سلسیوس، رطوبت 10 ± 50 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. حشرات کامل پس از ظهور، جمع‌آوری و به قیف‌هایی که انتهای آن‌ها با توری مسدود شده بود به‌منظور تخم‌ریزی منتقل شدند. تخم‌ها هر ۲۴ ساعت یک‌بار از روی بشقاب‌های تعبیه شده

(Huigens, 2003). نکته قابل تأمل در مورد زنبورهای پارازیتوئید آلوده به باکتری *Wolbachia* این است که با وجود تمام مزایا تنها ۱۸ گونه از ۱۸۰ گونه زنبور تریکوگراما آلوده به این باکتری هستند (Almeida, 2004). پدیده‌ی ماده‌زایی تحت تأثیر آلودگی به باکتری *Wolbachia* در جمعیت‌های متعلق به گونه *T. brassicae* نشان داده شده است (Poorjavand, 2011). سؤالی که در این جا مطرح می‌شود این است که چرا با وجود تمام مزایای آلودگی به باکتری ولباخیا، فراوانی ماده‌های آلوده در طبیعت کمتر است؟ بنابر اظهارات کیشانی و همکاران (Kishani et al., 2015)، زنبورهای تک‌جنسی قادر به ارزیابی کیفیت میزبان نبوده و تخم‌های باکیفیت و بی‌کیفیت میزبان ارزش غذایی مشابهی را برای زنبورهای ماده تخم‌گذار دارند ولی زنبورهای دوجنسی بچ‌های باکیفیت را به بچ‌های بی‌کیفیت جهت تخم‌گذاری ترجیح می‌دهند. به همین جهت زنبورهای تک‌جنسی به دلیل عدم توانایی تفکیک کیفیت میزبان، شانس زنده‌مانی نتاج خود را کاهش می‌دهند. در این تحقیق فرضیه احتمالی دیگری وجود دارد که پیشنهاد می‌کند باکتری ولباخیا در طبیعت از طریق ایجاد اختلال در رویارویی با دمای پایین سبب کاهش فراوانی زنبورهای پارازیتوئید تریکوگراما می‌شود.

هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر دمای پرورش نسل مادری به عنوان یک عامل اکولوژیک محیطی و نیز آلودگی به ولباخیا به عنوان یک عامل ژنتیک درونی بر درصد دیاپوز زنبور *T. brassicae* به منظور بررسی توانایی دیاپوز‌گذرانی دو جمعیت است. در بیشتر بررسی‌هایی که تاکنون در رابطه با بررسی اثر دما بر درصد دیاپوز صورت گرفته است، دما به عنوان یک عامل مستقیم تأثیرگذار بر القای دیاپوز در نظر گرفته شده است، در این مطالعه سعی بر بررسی اثر غیرمستقیم (مادری) دما بر درصد دیاپوز در دو جمعیت دوجنسی و تک‌جنسی *T. brassicae* شده است.

مواد و روش‌ها

پرورش آزمایشگاهی *Trichogramma brassicae*

خروجی به تعداد تخم‌های پارازیت (سیاه شده) محاسبه شد. از آنجا که حشرات ماده تخم‌گذار جنس تریکوگراما تنها یک تخم در تخم بیدآرد می‌گذارند (Garcia and Tavares, 2001)، تعداد حشرات کامل خارج شده برابر با تعداد تخم‌های *E. kuehniella* دارای سوراخ خروجی در نظر گرفته شد. درصد تلفات در هر یک از مراحل حشره کامل، شفیره و پیش‌شفیره نیز از طریق تقسیم تعداد حشره کامل، شفیره و پیش‌شفیره مرده به تعداد تخم‌های پارازیت (سیاه شده) محاسبه شد. داده‌های مربوط به هر کارت مقوایی به عنوان یک تکرار جداگانه ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به اثر دما و آلودگی به ولباخیا به طور جداگانه با استفاده از آزمون t-test به منظور مقایسه میانگین تخمگذاری و درصد دیپوز تجزیه و تحلیل شد. به منظور بررسی اثر دما روی نسبت جنسی افراد خارج شده (تعداد ماده به تعداد کل حشرات کامل)، تعداد افراد ماده خارج شده در دمای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس با تعداد افراد ماده خارج شده مورد انتظار با استفاده از آزمون کای اسکوئر مقایسه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار آماری SAS (ver. 9.2) انجام شد. جهت نرمال کردن داده‌های مربوط به درصد دیپوز از رابطه $\text{Arc sin}(\sqrt{X/100})$ استفاده شد. بررسی فرض نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و نرم‌افزار آماری Minitab (ver. 16) انجام شد.

نتایج

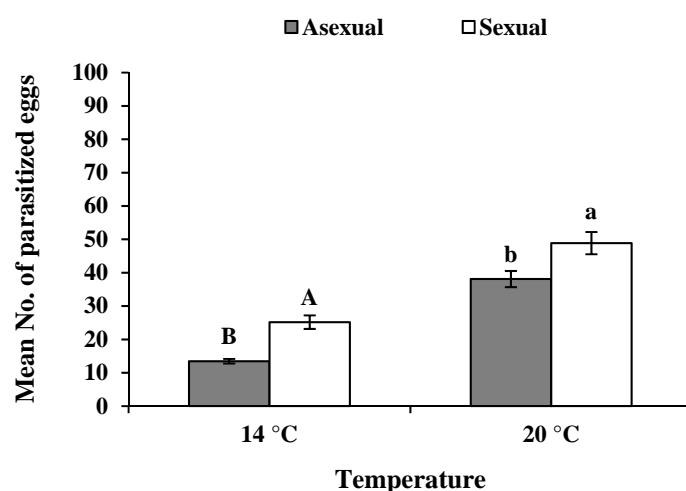
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که میانگین تخمگذاری (میانگین تعداد تخم به ازای هر حشره ماده) *T. brassicae* به دمای پرورش نسل مادری بستگی دارد ($t = 9/77$, $df = 158$, $P = < 0/001$) و از طرف دیگر، تفاوت آماری معنی‌دار در میانگین تخمگذاری دو جمعیت دوجنسی و تک‌جنسی مشاهده شد ($P = < 0/001$ ، $t = 3/73$, $df = 158$) (شکل ۱).

زیر قیف‌ها جمع‌آوری شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی اثر مادری دما بر درصد دیپوز دو جمعیت

T. brassicae

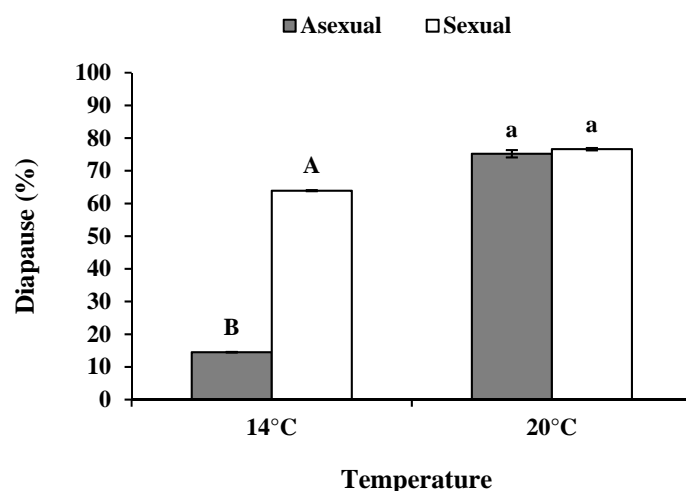
با توجه به اثر مادری طول دوره نوری بر القای دیپوز در زنبورهای جنس *Trichogramma*، نسل مادری هر دو جمعیت در دوره نوری ۱۰ ساعت روشنایی: ۱۴ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی $5 \pm 70\%$ درصد و دو دمای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس به صورت جداگانه پرورش یافت. پرورش نسل مادری در دوره نوری ۱۰ ساعت روشنایی: ۱۴ ساعت تاریکی سبب افزایش درصد دیپوز نسل دیپوز گذران می‌شود (داده‌های منتشر نشده). خروج حشرات کامل نسل مادری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، ۱۷-۱۸ روز پس از پارازیت شدن و در دمای ۱۴ درجه سلسیوس، ۴۵-۵۰ روز پس از پارازیت شدن مشاهده شد. یک روز پس از اوج خروج حشرات کامل نسل مادری در هر یک از دماهای مورد مطالعه، کارت‌های مقوایی به ابعاد 1×5 سانتی‌متر، هر یک حاوی ۱۰۰ عدد تخم با کیفیت *E. kuehniella* (شش ساعته) در اختیار ۴۰ زنبور ماده *T. brassicae* (یک‌روزه و آماده تخم‌گذاری) از هر دو جمعیت به صورت انفرادی قرار گرفت. کارت‌های مقوایی حاوی تخم‌های پارازیت *E. kuehniella* به شرایط القای دیپوز در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی $5 \pm 70\%$ درصد و تاریکی مطلق به مدت ۶۰ روز منتقل شد. پس از گذشت این مدت زمان، کارت‌های مقوایی به دمای 1 ± 25 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی $5 \pm 70\%$ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی: ۸ ساعت تاریکی جهت شکستن دیپوز منتقل شد. ۱۰ روز پس از مشاهده اوج خروج، تمامی تخم‌های پارازیت از لحاظ وجود سوراخ خروجی حشرات کامل مورد بررسی قرار گرفته و تخم‌های فاقد سوراخ خروجی تشریح شد. میزان تلفات در هر یک از مراحل حشره کامل، شفیره و پیش‌شفیره شمارش شد. درصد دیپوز برای هر یک از کارت‌های مقوایی حاوی تخم پارازیت از طریق تقسیم تعداد تخم‌های دارای سوراخ



شکل ۱- مقایسه میانگین تخم‌های پارازیت شده توسط زنبورهای پارازیتوئید دوجنسی و تک‌جنسی *Trichogramma brassicae* که نسل مادری آن‌ها در دماهای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس پرورش یافته بود

Figure 1. Comparison of mean number of parasitized eggs by asexual (infected) and sexual (uninfected) *Trichogramma brassicae* populations which their maternal generation reared at 14 and 20°C

همچنین نتایج نشان داد که درصد دیاپوز در این گونه به دمای پرورش نسل مادری بستگی دارد ($P < 0/001$, $t = 158$) شد (شکل ۲). دیاپوز بین دو جمعیت دوجنسی و تک‌جنسی نیز مشاهده شد ($t = 13/87$, $df = 158$, $P < 0/001$) (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه درصد دیاپوز زنبورهای پارازیتوئید دوجنسی و تک‌جنسی *Trichogramma brassicae* که نسل مادری آن‌ها در دماهای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس پرورش یافته بود

Figure 2. Comparison of diapause percentage between asexual (infected) and sexual (uninfected) *Trichogramma brassicae* populations which their maternal generation reared at 14 and 20°C

به دنبال آن، میزان تلفات در هر یک از مراحل پیش-شفیرگی، شفیرگی و حشره کامل مشابه و بیشترین میزان تلفات در مرحله پیش‌شفیرگی در هر دو جمعیت دوجنسی ($F = 134/12$, $df = 2$ و 117 , $P < 0/001$) و تک‌جنسی

نتایج به دست آمده نشان داد که میزان ورود به دیاپوز در دو جمعیت دوجنسی (۷۵/۲۰) و تک‌جنسی (۷۶/۶۲) که نسل مادری آن‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پرورش یافته بود مشابه و برابر با یک چهارم کل افراد پارازیت شده بود و

صورت پرورش نسل مادری در دمای ۱۴ درجه سلسیوس در مراحل لاروی، پیش شفیرگی و حشره کامل مشابه و تنها تفاوت افزایش چشمگیر میزان تلفات در مرحله شفیرگی در جمعیت تک جنسی در مقایسه با جمعیت دو جنسی است که بیانگر این حقیقت است که کاهش میزان ورود به دیاپوز در جمعیت تک جنسی به علت افزایش تلفات در مرحله شفیرگی بوده است. در صورت پرورش نسل مادری در دمای ۱۴ درجه سلسیوس، بیشترین میزان تلفات در مرحله پیش شفیرگی برای جمعیت دو جنسی ($P = < 0/001$) و ۱۱۷ و تک جنسی ($P = < 0/001$) و ۱۱۷ ($F = 371/51$, $df = 2$) و مرحله شفیرگی برای جمعیت تک جنسی ($P = < 0/001$) و ۱۱۷ ($F = 62/20$, $df = 2$) مشاهده شد (جدول ۱).

($P = < 0/001$) و ۱۱۷ ($F = 84/87$, $df = 2$) مشاهده شد. در رابطه با افرادی که نسل مادری آن‌ها در دمای ۱۴ درجه سلسیوس پرورش یافته بودند، میزان ورود به دیاپوز در جمعیت دو جنسی برابر با ۶۳/۹۰ درصد و در جمعیت تک جنسی برابر با ۱۴/۵۰ درصد از کل افراد پارازیته بود. این نتایج بیانگر پاسخ متفاوت دو جمعیت در میزان ورود به دیاپوز در صورت پرورش نسل مادری در دمای ۱۴ درجه سلسیوس و پاسخ مشابه دو جمعیت در صورت پرورش نسل مادری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بود. در واقع، جمعیت تک جنسی در مقایسه با جمعیت دو جنسی به میزان بسیار کمتری در صورت پرورش نسل مادری در دمای ۱۴ درجه سلسیوس وارد دیاپوز شد. میزان تلفات در دو جمعیت در

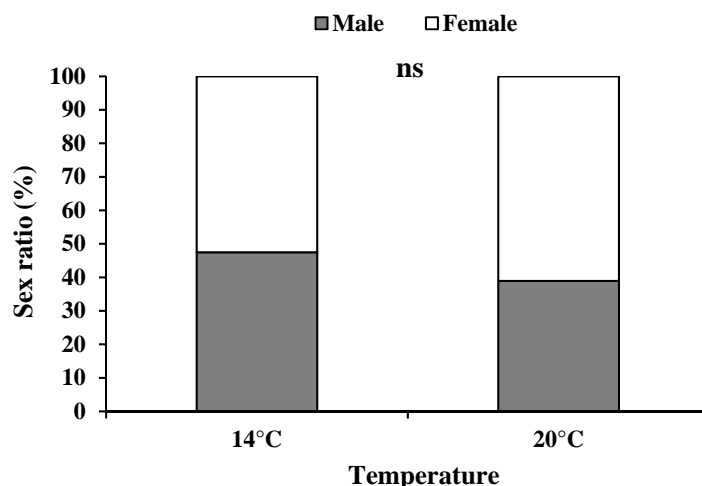
جدول ۱- مقایسه (%) دیاپوز و (%) تلفات در هر یک از مراحل پیش شفیرگی، شفیرگی و حشره کامل زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* دو جنسی و تک جنسی که نسل مادری آن‌ها در دماهای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس پرورش یافته بودند. W^+ معرف پارازیتوئیدهای آلوده به ولباخیا و W^- معرف پارازیتوئیدهای غیر آلوده است.

Table 1. Comparison of diapause and mortality percentage of *Trichogramma brassicae* in pre-pupal, pupal and adult stages in both asexual (infected) and sexual (uninfected) populations which their maternal generation reared at 14 and 20°C. W^+ shows *Wolbachia*-infected parasitoids and W^- shows *Wolbachia*-uninfected parasitoids.

Maternal Temperature	Mortality of different developmental stages (%)							
	Diapause (%) at 10°C		Prepupae		Pupae		Adult	
	W^+	W^-	W^+	W^-	W^+	W^-	W^+	W^-
14 °C	63.90±0.18	14.50±0.11	32.56±0.13	33.09±0.16	1.62±0.02	51.12±0.37	1.72±0.02	1.30±0.02
20 °C	76.62±0.38	75.20±1.12	21.38±0.13	22.05±0.18	0.79±0.02	1.10±0.05	1.21±0.04	1.65±0.05

کل افراد نسبت به مقدار مورد انتظار (۵۰٪) در دمای ۱۴ (۱) $P = 0/001$ ، $df = 175$ ، $\chi^2 = 66/26$ و ۲۰ درجه سلسیوس (۱) $P = 0/001$ ، $df = 175$ ، $\chi^2 = 72/28$ مشاهده نشد.

بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش دمای پرورش نسل مادری نسبت افراد ماده به نر افزایش یافت (شکل ۳). با وجود این، تفاوت آماری معنی داری در نسبت افراد ماده به



شکل ۳- مقایسه درصد افراد ماده: نر زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* دوجنسی در دو دمای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس

Figure 3. Comparison of female/male percentage in sexual (uninfected) *Trichogramma brassicae* at 14 and 20°C

متفاوت دو جمعیت شده است. بنابر نتایج به دست آمده، آلودگی به ولباخیا نه تنها از طریق کاهش درصد دیاپوز بلکه از طریق تغییر الگوی پاسخ زنبورهای مادری بر دیاپوز نتایج زنبور پارازیتوئید نیز تأثیر می‌گذارد. بر این اساس، درصد دیاپوز در جمعیت تک‌جنسی در صورت پرورش نسل مادری در دو دمای ۱۴ و ۲۰ درجه سلسیوس دارای اختلاف چشمگیری در مقایسه با جمعیت دوجنسی بود.

نسبت جنسی پارازیتوئیدها و تعداد حشره‌ی ماده‌ای که وارد اکوسیستم زراعی می‌شود از نظر کاربردی حائز اهمیت بوده و از طرفی نیز افزایش زنبورهای نر در سیستم پرورش انبوه از موارد نامطلوب به شمار می‌آید. به بیان دیگر هر اندازه تعداد افراد ماده بیشتر باشد، می‌تواند نرخ رشد جمعیت و اثر بخش بودن آنها را در برنامه‌های کنترل بیولوژیک افزایش دهد، چرا که زنبورهای نر عملاً نقشی در ایجاد تلفات در آفت هدف ندارند (Heimpel and Lundgren, 2000). نتایج تحقیق حاضر نشان داد در صورت پرورش نسل مادری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، نسبت افراد ماده (دیپلوئید) بیش از افراد نر (هاپلوئید) است. از طرفی نسبت جنسی افرادی که نسل مادری آنها در دمای ۱۴ درجه سلسیوس رشد یافته‌اند، برابر با 0.3 ± 0.45 درصد (تعداد ماده به تعداد کل افراد خارج شده) بود که نسبت به

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، جمعیت تک‌جنسی در مقایسه با جمعیت دوجنسی از توانایی کمتری در ورود و خروج از دیاپوز برخوردار است. به بیان دیگر جمعیت تک‌جنسی در صورت رویارویی با دمای پایین از تلفات بیشتری برخوردار خواهد بود (جدول ۱). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران در ارتباط با مقایسه دو جمعیت غیرآلوده و آلوده به باکتری ولباخیا به دست آمده است. در رابطه با زنبور پارازیتوئید *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hym.: Pteromalidae) زنبورهای آلوده به ولباخیا (تک‌جنسی) از تلفات بیشتری در صورت قرارگیری در دمای پایین برخوردار بودند (Bordenstein and Werren, 2000). همچنین نتایج به دست آمده توسط پینتوریو و همکاران (Pintureau et al., 2003) حاکی از افزایش میزان تلفات *T. oleae* Voegelé and Pointel آلوده به ولباخیا در مقایسه با افراد غیرآلوده در دمای پایین بود.

با توجه به یکسان بودن منشأ جغرافیایی (مزارع ذرت در استان مازندران) دو جمعیت تک‌جنسی و دوجنسی در این تحقیق به نظر می‌رسد که تنها عامل متفاوت، حضور باکتری ولباخیا در جمعیت تک‌جنسی باشد که منجر به پاسخ

مادری برابر با ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس و دمای آستانه برای القای دیپوز در نسل دیپوز گذران پایین تر از ۱۵ درجه سلسیوس بود (Vaghina et al., 2014).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، دیپوز نتاج در هر دو جمعیت تک جنسی و دوجنسی *T. brassicae* تحت تأثیر دمای پرورش نسل مادری است. بر این اساس، پرورش نسل مادری فارغ از آلودگی به ولباخیا در دمای ۱۴ درجه سلسیوس منجر به کاهش نسبت افراد دیپوز گذران شد. در دمای ۱۴ درجه سلسیوس، درصد دیپوز جمعیت تک جنسی دارای کاهش چشمگیری در مقایسه با جمعیت دوجنسی بود. حال آن که درصد دیپوز دو جمعیت تک جنسی و دوجنسی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تفاوت ناچیزی را نشان داد. بنابر این نتایج به نظر می رسد تراکم باکتری ولباخیا در بدن ماده های تخم گذار در دمای ۱۴ درجه سلسیوس افزایش و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس کاهش می یابد. بر این اساس، انتظار می رود که رفتار ماده های تک جنسی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به ماده های دوجنسی نزدیک تر شود که نتایج حاصل نیز تأیید کننده این امر است. به طور مسلم حضور باکتری ولباخیا در جمعیت آلوده، هزینه هایی را بر پارازیتوئید تحمیل می کند که سبب کاهش انرژی لازم جهت مقابله با دمای پایین شده و حساسیت مرحله مقاوم به دمای پایین را افزایش می دهد و در نهایت منجر به افزایش تلفات در صورت رویارویی با دمای پایین و کاهش جمعیت در طبیعت می شود. به بیان دیگر آلودگی به ولباخیا علاوه بر کاهش درصد دیپوز سبب تغییر نوع پاسخ جمعیت تک-جنسی در مقایسه با جمعیت دوجنسی در میزان ورود به دیپوز تحت تأثیر دمای پرورش نسل مادری نیز می شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات پژوهشی گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران و با استفاده از حمایت های مالی قطب علمی کنترل بیولوژیک آفات گیاهی و همچنین موسسه پژوهشی کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های

دمای ۲۰ درجه سلسیوس (0.02 ± 0.52 درصد) افزایش تلفات افراد ماده را در برداشت. اگرچه کاهش افراد ماده به دنبال کاهش دمای نسل مادری فاقد اثر معنی دار بود، اما نشان دهنده اثرگذاری دمای پرورش نسل مادری بر افزایش میزان تلفات نتاج ماده در مقایسه با نتاج نر بود، به طوری که سبب کاهش نسبت افراد ماده شد.

بر اساس نتایج به دست آمده، هر دو فرضیه این تحقیق شامل درصد دیپوز کمتر جمعیت تک جنسی فارغ از دمای پرورش نسل مادری و افزایش درصد دیپوز همراه با افزایش دمای پرورش نسل مادری به اثبات رسید. نتایج مشابه با تحقیق حاضر در سایر مطالعات نیز مشاهده شد، زمانی که دما در پایین در حدود ۱۵-۱۰ درجه سلسیوس است، زنبورهای تریکوگراما وارد دیپوز می شوند (Ma and Chen, 2006; Reznik et al., 2008; Sorokina, 2010). در این تحقیق، با افزایش دمای پرورش نسل مادری از ۱۴ به ۲۰ درجه سلسیوس میزان دیپوز نیز افزایش یافت. از طرف دیگر، این طور به نظر می رسد که رشد نسل مادری در دمای ۱۴ درجه سلسیوس نسبت به دمای ۲۰ درجه سلسیوس نیازمند انرژی بیشتری بوده که سبب کاهش عملکرد آن در تولید نتاج مقاوم به دمای پایین شده است.

بررسی اثر مادری دما در گونه های مختلف جنس تریکوگراما، نتایج به طور کامل متناقضی را نشان داده است، به طوری که نه تنها الگو و دامنه بلکه نوع واکنش نیز در گونه های مختلف متفاوت بود. در برخی موارد با افزایش دما میزان دیپوز افزایش (Sorokina, 2010) و در سایر موارد، با افزایش دمای نسل مادری به صورت چشمگیری کاهش یافت (Mai and Zaslavskii, 1983; Sorokina, 1987; 1986; and Maslennikova). نتایج مشابه با تحقیق حاضر در رابطه با گونه های *T. semblidis* (Auriv.) و *T. embryophagum* Htg. مشاهده شد (Zaslavski and Umarova, 1990; Voinovich et al., 2002). نتایج مشابه با این تحقیق در رابطه با گونه *T. telegani* نیز مشاهده شد، به طوری که با افزایش دمای پرورش نسل مادری، درصد نتاج دیپوز گذران افزایش یافت. در این گونه دمای آستانه برای القای دیپوز در نسل

- T. جمعیت تک جنسی و دوجنسی زنبور پارازیتوید *brassicae* اسپاسگزاراری می شود. دانشگاه تهران انجام شده است. از خانم دکتر نفیسه پورجواد، استادیار دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان بخاطر مساعدت هایشان در شناسایی هر دو

References

- Almeida, R.** 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. PhD. Thesis. Wageningen University.
- Boivin, G.** 1994. Overwintering strategies of egg parasitoids. In Wajnberg, E. and Hassan, S. A. (Eds.). Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford. pp. 219-244.
- Bordenstein, S. R. and Werren, J. H.** 2000. Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? *Heredity* 84: 54-62.
- Chernysh, S. I., Simonenko, N. P. and Numata, H.** 1995. Sensitive stage for the diapause-averting effect of high temperature in the blowfly, *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *Applied Entomology and Zoology* 30: 498-499.
- Denlinger, D. L., Yocum, G. D. and Rinehart, J. P.** 2012. Hormonal control of diapause. In Gilbert, L. I. (Ed.). Insect Endocrinology. Elsevier, UK. pp. 430-463.
- Ebrahimi, E., Pintureau, B. and Shojai, M.** 1998. Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. *Applied Entomology and Phytopathology* 66: 39-43.
- Farrokhi, S., Ashouri, A., Shirazi, J., Allahyari, H. and 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): 1-11.
- Fukumoto, E., Numata, H. and Shiga, S.** 2006. Effects of temperature of adults and eggs on the induction of embryonic diapause in the band-legged ground cricket, *Dianemobius nigrofasciatus*. *Physiological Entomology* 31: 211-217.
- Garcia, P. and Tavares, J.** 2001. Effect of host viability on *Trichogramma cordubensis* (Insecta: Hymenoptera) reproductive strategies. *Arquipelago—Life and Marine Sciences Suppl (Part B)* 2: 43-49.
- Heimpel, G. E. and Lundgren, J. G.** 2000. Sex ratios of commercially reared biological control agents. *Biological Control* 19: 77-93.
- Huigens, M. E.** 2003. On the evolution of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Trichogramma* wasps. PhD. Thesis. Wageningen University.
- Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., Schulenburg, J. H. G. V. D. and Fuyama, Y.** 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.
- Jarosik, V., Honek, A., Magarey, R. D. and Skuhrovec, J.** 2011. Developmental database for phenology models: related insect and mite species have similar thermal requirements. *Journal of Economic Entomology* 104: 1870-1876.
- Kishani Farahani, H., Ashouri, A., Goldansaz, S. H., Farrokhi, S., Ainouche, A. and van Baaren, J.** 2015. Does *Wolbachia* infection affect decision-making in a parasitic wasp? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155 (2): 102-116.
- Laing, J. E. and Corrigan, J. E.** 1995. Diapause induction and post-diapause emergence in *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): the role of host species, temperature, and photoperiod. *Canadian Entomologist* 127: 103-110.
- Ma, C. S. and Chen, Y. W.** 2006. Effects of constant temperature, exposure period, and age on diapause induction in *Trichogramma dendrolimi*. *Biological Control* 36: 267-273.
- Mai, F. K. and Zaslavskii, V. A.** 1983. Photoperiodic and thermal responses of *Trichogramma euproctidis* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Zoologicheskii Zhurnal* 62: 1676-1680.
- Pintureau, B., Pizzol, J. and Bolland, P.** 2003. Effects of endosymbiotic *Wolbachia* on the diapause in *Trichogramma* hosts and effects of the diapause on *Wolbachia*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 106: 193-200.

- Poorjavad, N.** 2011. Morphological, molecular and reproductive compatibility studies on the systematic of the genus *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Tehran and Mazandran province (Iran). PhD. Thesis. University of Tehran.
- Reznik, S. Y., Vaghina, N. P. and Voinovich, N. D.** 2008. Diapause induction in *Trichogramma embryophagum* Htg. (Hymenoptera, Trichogrammatidae): the dynamics of thermosensitivity. **Journal of Applied Entomology** 132: 502-509.
- Reznik, S. Y., Vaghina, N. P. and Voinovich, N. D.** 2011. Maternal influence on diapause induction in *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae): the dynamics of photosensitivity. **Journal of Applied Entomology** 135: 438-445.
- Saunders, D. S., Steel, C. G. H., Vafopoulou, X. and Lewis, R. D.** 2002. Insect clocks (3rd ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Shintani, Y. and Higuchi, H.** 2008. Developmental parameters and photoperiodism in *Trigonotylus tenuis* (Reuter) (Heteroptera: Miridae). **Applied Entomology Zoology** 43: 259-264.
- Smith, S. M.** 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. **Annual Review of Entomology** 41: 375-406.
- Sorokina, A. P. and Maslennikova, V. A.** 1986. The peculiarities of photo-thermal reactions in selected species of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Vestnik Leningrad Gos University** 3 (1): 9-14.
- Sorokina, A. P. and Maslennikova, V. A.** 1987. Temperature optimum for diapause induction in species of the genus *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Entomologicheskoe Obozrenie** 66 (4): 689-699.
- Sorokina, A. P.** 2010. Photo-thermal reactions controlling diapause in three species of *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) from Leningrad province. **Vestnik Zashch Rast** 3: 51-54.
- Stouthamer, R. and Kazmer, D. J.** 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Journal of Heredity** 73: 317-327.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A. and Masaki, S.** 1986. Seasonal Adaptations of Insects. Oxford University Press, New York.
- Tachibana, S. I. and Numata, H.** 2004. Parental and direct effects of photoperiod and temperature on the induction of larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. **Physiological Entomology** 29: 39-44.
- Vaghina, N. P., Voinovich, N. D. and Reznik, S. Y.** 2014. Maternal thermal and photoperiodic effects on the progeny diapause in *Trichogramma telengai* Sorokina (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomological Science** 17: 198-206.
- Voinovich, N. D., Umarova, T. Y., Kats, T. S. and Reznik, S. Y.** 2002. The role of endogenous factors in diapause induction in *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Entomological Review** 82 (9): 1233-1237.
- Voinovich, N. D., Vaghina, N. P. and Reznik, S. Y.** 2013. Comparative analysis of maternal and grand-maternal photoperiodic responses of *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **European Journal of Entomology** 110: 451-460.
- Zaslavskii, V. A. and Umarova, T. Y.** 1990. Environmental and endogenous control of diapause in *Trichogramma* species. **Entomophaga** 35: 23-29.

The maternal effect of temperature on diapause induction in *Wolbachia*-infected and uninfected *Trichogramma brassicae*

S. Rahimi Kaldeh¹, A. Ashouri^{1*}, A. Bandani¹ and S. A. Modarres Hasani¹

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: March 17, 2017- Accepted: August 12, 2017)

Abstract

In present study, the maternal effect of temperature as an ecologic factor and the effect of *Wolbachia* infection as an inner-genetic factor on diapause percentage of *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hym.: Trichogrammatidae) were investigated. Maternal generation of both infected (asexual) and uninfected (sexual) populations were reared separately at 14 and 20°C. After maximum adult emergence (24 hours), asexual females and sexual-mated females (both 24h old) were separately selected and placed in glass test tubes. Each of them were supplied with a cardboard which included 100 eggs of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) (6 hours old). The results revealed that *Wolbachia* infection and rearing temperature of maternal generation had significant effect on diapause percentage of *T. brassicae*. When rearing temperature increased, the diapause percentage had increased too. Diapause percentage in uninfected (sexual) population was higher than infected (asexual) ones which show the negative effect of *Wolbachia* infection. Probably, presence of *Wolbachia* causes energy reduction in facing low temperature.

Key words: Diapause, parasitoid, temperature, *Trichogramma brassicae*, *Wolbachia*

*Corresponding author: ashouri@ut.ac.ir