آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۹۰، شماره ۲، اسفند ۱۴۰۱
Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 90, No. 2, March 2023
DOI: 10.22092/JAEP.2023.361555.1473

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر باکتری هم‌زیست *Wolbachia* روی برخی شاخص‌های زیستی زنبور *Trichogramma brassicae* در شرایط آزمایشگاه و سردخانه

شهرام فرخی[۱]✉، فاخره حسینی[۲]، جلال شیرازی[۳]، علی احدیت[۴]

۱، ۳- به‌ترتیب استادیار، دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛
۲، ٤- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر باکتری هم‌زیست درون سلولی *Wolbachia* روی قدرت جستجو، زمان دست‌یابی و درصد خروج زنبورهای *Trichogramma brassicae* ماده‌زا (A)، دوجنسی طبیعی (B) و دوجنسی درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک (CB) در آزمایشگاه و سردخانه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش واکنش تابعی این سه جمعیت نسبت به تراکم‌های مختلف تخم پروانه آرد، از نوع دوم (II) به دست آمد و بین قدرت جستجو (*a*) و زمان دست‌یابی (T_h) آنها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بر اساس نتایج حاصل از ذخیره‌سازی کوتاه مدت در سردخانه، میانگین کل درصد خروج زنبورهای دوجنسی طبیعی، ماده‌زای آلوده به باکتری و دوجنسی درمان شده با آنتی‌بیوتیک پرورش یافته در ۲۰ درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری نسبت به دمای ۲۵ درجه بیشتر بود. اما در دوره‌های ذخیره‌سازی مشابه، هر سه جمعیت از نظر درصد خروج بدون تفاوت معنی‌دار در گروه‌های مشترک قرار گرفتند. با توجه به نتایج این بررسی و یافته‌های قبلی، با فراهم نمودن شرایط بهینه تکثیر و نگهداری لاین‌های آلوده به *Wolbachia*، استفاده از زنبورهای تک‌جنسی در مقایسه با دوجنسی طبیعی می‌تواند دارای مزیت نسبی باشد که در این مقاله مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: القاء بکرزایی، ذخیره‌سازی، زنبور پارازیتوئید ماده‌زا، واکنش تابعی

Effects of *Wolbachia* symbiotic bacterium on some biological characteristics of *Trichogramma brassicae* in laboratory and cold storage conditions

S. FARROKHI[1]✉, F. HOSSEINI[2], J. SHIRAZI[3], A. AHADIYAT[4]

1, 3. Respectively Assistant Professor, Associate Professor, of Iranian Research Institute of Plant Protection, AREEO, Tehran, Iran;
2, 4. Respectively former MSc student, Assistant Professor, of Plant Protection Dept., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

In this research, the effect of the intracellular symbiotic *Wolbachia* bacteria on attack rate (*a*), handling time (T_h) and emergence rate of *Wolbachia* infected asexual (A), natural bisexual (B) and cured bisexual by antibiotic (CB) strains of *Trichogramma brassicae* was studied under laboratory and cold storage conditions. The evaluation of functional response of the *Trichogramma* strains exposed to different densities of *Ephestia kuehniella* eggs revealed type II, and no significant difference was observed between the attack rate and their handling time. Based on the results of short-term cold storage, the hatching rate of all three populations reared at 20°C was higher than populations reared at 25°C, and statistically had a significant difference. However, in similar storage periods, the populations infected (A) and non-infected (B and CB) were in the same groups with no significant difference in terms of the emergence rate. According to the results of this study and previous findings, by providing optimal conditions for reproduction and maintenance of *Wolbachia* infected lines, the use of thelytokous *Trichogramma* wasps would be more economical compared with natural sexual populations, which is discussed in this article.

Keywords: Functional response, parthenogenesis inducing, storage, thelytokous parasitoid

✉ **shahram.farrokhi@gmail.com**

© **2023, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)**

مقدمه

آنچه امروزه در مدیریت کشاورزی مطرح می‌باشد کاهش مصرف سموم شیمیایی، حفظ محیط زیست و حمایت از دشمنان طبیعی و در نهایت تولید غذای سالم است. لذا متخصصین کنترل بیولوژیک همواره در پی راهکارهایی برای بهبود و افزایش کارایی دشمنان طبیعی در مناطق و زیست بوم‌های مختلف هستند. از جمله عواملی که موفقیت یک دشمن طبیعی را قبل از رهاسازی تضمین می‌کند، شناخت ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری در یک جمعیت یا اکوتیپ مناسب است (Hassan, 1990; Kazmer & Luck, 1995). از میان این معیارها نسبت جنسی ایجاد شده توسط زنبور ماده، معیار کیفی مهمی محسوب می‌شود و از آنجا که زنبورهای پارازیتوئید ماده عامل اصلی کشتن آفت می‌باشند، فرضیاتی مبنی بر مزیت استفاده از گونه‌ها یا جمعیت‌های تک‌جنسی زنبورهای پارازیتوئید در رهاسازی علیه یک آفت بوجود آمد (Aeschliman, 1990; Stouthamer, 2003).

زنبور تریکوگراما با بیش از ۱۸۰ گونه بزرگ‌ترین و شناخته شده‌ترین جنس از خانواده Trichogrammatidae محسوب می‌شود که به دلیل سهولت تکثیر انبوه و امکان استفاده از گونه‌های مختلف آن به‌عنوان پارازیتوئید تخم بالپولکداران خسارت‌زای محصولات کشاورزی، از نظر کاربردی بیشترین سطح رهاسازی را در جهان در بین دشمنان طبیعی آفات به خود اختصاص داده است (Li, 1994; Bale *et al*., 2008). پس از معرفی گونه‌های ماده‌زای زنبور تریکوگراما در دهه ۹۰ میلادی مطالعات زیادی روی عوامل ایجاد کننده و مزیت‌های استفاده از زنبور تریکوگرامای تک‌جنسی صورت‌گرفت (Stouthamer, 2003). عامل تولیدمثل زنبورها به شیوه تک‌جنسی (بکر ماده‌زایی: thelytokous parthenogenesis) می‌تواند منشأ ژنتیکی و یا میکروبی داشته باشد که باعث بوجود آمدن جنس ماده از تخم‌های بارور نشده می‌شود. در زنبور *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) علت اصلی ماده‌زایی ژنتیکی تشخیص داده شده است (Stouthamer & Kazmer, 1994). باکتری *Wolbachia* در بیش از ۱۸ گونه زنبور تریکوگراما به‌عنوان علت القاء بکرزایی (PI: Parthenogenesis inducing) شناخته شده و امکان انتقال افقی درون و بین گونه‌ای آن نیز وجود دارد (Stouthamer, 1997; Huigens *et al*., 2000; Farrokhi *et al*., 2010a) در بین زنبورهای تریکوگرامای شناخته شده در ایران، *Trichogramma brassicae* Bezd. به‌عنوان گونه غالب در کل کشور معرفی شده (Ebrahimi *et al*., 1998) و ماده‌زایی در جمعیت‌هایی از این گونه بر اثر آلودگی باکتری *Wolbachia* با روش‌های مولکولی به اثبات رسیده است (Farrokhi *et al*., 2012).

نتایج بررسی‌های متعددی که به منظور تعیین اثرات مختلف باکتری هم‌زیست ولباکیا روی شایستگی میزبان (host fitness) صورت گرفته حاکی از اثرات بسیار متفاوت این باکتری روی شاخص‌های زیستی، بویایی‌سنجی و ریخت‌شناسی زنبور تریکوگراما از جمله میزان باروری، طول عمر، نرخ پارازیتیسم، درصد خروج، قدرت پراکنش، تشخیص میزبان، طول ساق پا و غیره می‌باشد که برخی از نتایج مرتبط با موضوع مورد بحث قرار خواهد گرفت (Stouthamer & Luck 1993; Silva, 1999; Silva *et al*., 2000; Tagami *et al*., 2001 & 2002; Miura & Tagami, 2004; Hohmann *et al*., 2001; Hohmann & Luck, 2000; Huigens *et al*., 2004; Grenier *et al*., 2002; Pintureau *et al*., 2003; Almeida, 2004; Farrokhi, 2010; Farrokhi *et al*., 2013; Nazari *et al*., 2015; Kishani Farahani *et al*., 2015). در ادامه تحقیقات انجام شده توسط Farrokhi *et al*. (2010b) و به منظور بررسی دقیق‌تر اثرات باکتری *Wolbachia* روی شاخص‌های مختلف زنبور تریکوگراما، در این پژوهش ضمن اضافه کردن جمعیت دوجنسی ناشی از حذف باکتری از بدن زنبورهای آلوده با استفاده از انتی‌بیوتیک و تعیین واکنش تابعی سه جمعیت تک‌جنسی و دوجنسی *T. brassicae*، نتیجه ذخیره‌سازی تخم‌های پارازیت شده پروانه آرد، توسط جمعیت‌های مذکور مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

جمع‌آوری و شناسایی اکوتیپ‌های ماده‌زای زنبور تریکوگراما

برای دستیابی به جمعیت ماده‌زای زنبور *Trichogramma*، دستجات تخم پارازیته از روی علف‌های هرز، از جمله گیاه مستک *Xanthium strumarium* L. (Asterales: Asteraceae) و مزارع ذرت و برنج استان مازندران جمع‌آوری شد. پس از انتقال تخم‌های پارازیته به اتاق حرارت ثابت و خروج زنبورها، هریک از سوش‌ها به‌تفکیک محل جمع‌آوری و نوع میزبان در دمای ۱۰±۶۰ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶ و تاریکی ۸ ساعت روی تخم عقیم شده پروانه آرد، *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lep: Pyralidae)، پرورش داده شدند. پیش از خروج زنبور از تخم‌های سیاه رنگ پارازیته، هر یک از آنها به‌صورت انفرادی در لوله‌های آزمایشی (۷۵ × ۱۲ میلی‌متر) قرار داده شد. و بلافاصله پس از ظهور زنبورهای ماده نوارهای کاغذی حاوی تخم تازه افستیا در اختیار هر یک از آنها قرار داده و نوع بکرزائی در زنبورهای باکره به روش ماده انفرادی (isofemale) تعیین شد.

با مشاهده افراد ماده‌زا در هر یک از جمعیت‌ها، نسبت به ایجاد لاین خالص و تداوم پرورش آن در شرایط مناسب و کنترل شده اقدام شد. برای اثبات احتمال ماده‌زایی توسط باکتری *Wolbachia* ابتدا زنبورهای ماده با محلول آب و عسل و آنتی‌بیوتیک (Tagami *et al*., 2002) تغذیه شدند و مجدداً نحوه تولیدمثل آنها پس از ۴-۳ نسل بررسی شد. درصورت بازگشت به حالت دوجنسی احتمال آلودگی به باکتری القاءکننده بکرزایی زیاد بوده که برای تأیید نهایی، از روش مولکولی و پرایمر اختصاصی ژن *wsp* استفاده شد (Pintureau *et al*., 2002; Farrokhi *et al*., 2012). برای شناسایی زنبورها علاوه بر استفاده از کلید مربوط به صفات مرفولوژیک (Ebrahimi *et al*., 1998)، از روش شناسایی مولکولی براساس ناحیه ITS2 نیز اقدام شد (Stouthamer *et al*., 1999; Farrokhi. 2010; Silva, 1999).

ایجاد جمعیت‌های دوجنسی و ماده‌زای آلوده به باکتری *Wolbachia*

در این تحقیق برای ارزیابی اثر باکتری ولباکیا و مقایسه برخی ویژگی‌های جمعیت‌های دوجنسی و ماده‌زا، به روش ماده انفرادی سه لاین خالص شده از جمعیت بابلسر *T. brassicae* با اسامی اختصاری A (Asexual)، B (Bisxeual) و CB (Cured Bisexual) ایجاد شد. لاین A آلوده به PI-*Wolbachia* بود. در جمعیت B تولیدمثل دوجنسی به‌صورت طبیعی وجود داشت و لاین دوجنسی CB با استفاده از آنتی‌بیوتیک درمانی بوجود آمد. به این منظور به‌مدت چهار نسل زنبورهای ماده آلوده به باکتری (A) با آب و عسل آغشته به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین هیدروکلراید (SIGMA) به نسبت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغذیه (Tagami *et al*., 2002) و در شرایط آزمایشگاه (۱°C±۲۰، رطوبت‌نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶:۸) پرورش داده شدند. پرورش لاین‌های مورد نظر به‌صورت جداگانه در دو دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس ادامه یافت. به‌منظور حذف و جلوگیری از اثر احتمالی انتی‌بیوتیک، همه آزمایش‌ها در نسل‌های چهار به بعد انجام شد.

آزمون واکنش تابعی

برای ارزیابی واکنش تابعی جمعیت‌های زنبور *T. brassicae* تراکم‌های ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۶۵ و ۸۵ عدد تخم تازه افستیا که با اشعه UV عقیم شده بودند، با توزیع و پراکندگی تصادفی روی نوار مقوایی سفید رنگ (۴۰ × ۱۰ میلی‌متر) چسبانده شدند. برای هر تراکم، زنبورهای ماده‌ای با طول عمر کمتر از ۲۴ ساعت (در مورد جمعیت دوجنسی از زنبورهای جفت‌گیری شده استفاده شد) در ۱۸ تکرار به‌صورت مجزا و به تفکیک هر جمعیت در لوله‌های آزمایش (۱۰۰ × ۱۶ میلی‌متر) حاوی تراکم مشخصی از تخم میزبان قرار داده شدند. نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان در اتاق حرارت ثابت (۱°C±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت) قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت حشرات کامل زنبور از لوله‌ها حذف و نمونه‌ها تا سیاه شدن تخم پارازیته در همان شرایط محیطی نگهداری شدند و در نهایت تعداد تخم پارازیت شده در هر تراکم برای هریک از جمعیت‌ها ثبت شد.

تجزیه و تحلیل واکنش‌های تابعی مشتمل بر دو مرحله مجزا بود (Juliano, 2001 ،De Clercq *et al*., 2000 ،Mohaghegh

et al., 2001 و Allahyari, *et al*., 2004) در مرحله اول، شکل منحنی یا نوع واکنش تابعی از رگرسیون لجیستیک (logistic regression) نسبت تخم‌های پارازیته (N_a) به تراکم اولیه‌ی تخم میزبان (N_0) بر اساس معادله‌ی چند جمله‌ای زیر تعیین شد:

$$\frac{N_a}{N_0} = \frac{\exp(P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^2 + P_3N_0^3)}{1+\exp(P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^2 + P_3N_0^3)}$$

سپس، پراسنجه‌های $P_0 - P_3$ با رویه CATMOD در نرم‌افزار SAS برآورد شدند (Juliano, 2001). در مرحله دوم با استفاده از رگرسیون غیرخطی Least square (رویه NLIN با تکنیک DUD در نرم‌افزار SAS) پارامترهای قدرت جستجو یا ضریب حمله (a) و زمان دستیابی (T_h) برآورد شدند. برای مقایسه پراسنجه‌های برآورد شده در جمعیت‌های مختلف به‌صورت مقایسه دوتایی از معادله زیر استفاده شد:

$$N_a = \frac{[a + D_a(j)]TN_0}{1+[a + D_a(j)][T_h + D_{Th}(j)]N_0}$$

که j شاخص متغیری است که مقدار آن برای جمعیت‌های اول و دوم به‌ترتیب یک و صفر در نظر گرفته شد. پراسنجه‌های D_a و D_{Th} برای تعیین تفاوت آماری ضریب حمله (a) و زمان دستیابی (T_h) جمعیت‌های مزبور مورد استفاده قرار گرفتند (Juliano, 2001). حداکثر نرخ حمله نیز بر مبنای نسبت کل زمان آزمایش به زمان دستیابی به یک میزبان (T/T_h) محاسبه شد (Hassel, 1978).

در بسیاری از تحقیقات مربوط به واکنش تابعی، پراسنجه‌های ضریب حمله و زمان دستیابی بیشتر جنبه مقایسه‌ای داشته که در این تحقیق نیز برای ارزیابی تأثیر باکتری *Wolbachia* روی رفتار پارازیتیسم زنبورهای دوجنسی (B و CB) و تک‌جنسی (A) زنبور *T. brassicae* جمعیت‌ها دو به دو مقایسه شدند.

تعیین درصد خروج زنبورهای ذخیره سازی شده در سرما

به منظور ارزیابی تأثیر مدت ذخیره‌سازی بر میزان خروج هریک از لاین‌های A، B و CB پرورش یافته در دو دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس، نوارهای کاغذی حاوی تخم تازه افستیا به‌مدت ۲٤ ساعت و به تفکیک در اختیار هریک از آنها قرار داده شد. سپس تخم‌های پارازیت شده در ۲۰ لوله آزمایش شیشه به ابعاد ۱۰۰×۱٦ میلی‌متر در شرایط محیط پرورش زنبورها نگهداری شدند. پس از رسیدن به مرحله پیش‌شفیرگی یا شفیره چشم سفید (تقریباً ۱۰ روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) لوله‌های حاوی تخم در سردخانه (۸ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق) به‌مدت یک، ۲، ٤، ۵، ٦ و ۷ هفته قرار داده شدند. پس از سپری‌شدن مدت ذخیره‌سازی، لوله‌ها از سردخانه خارج و به دمای ۲۵ درجه سلسیوس انتقال داده شدند. پس از خروج زنبورها ضمن بررسی نسبت جنسی، درصد خروج هر یک از جمعیت‌های A، B و CB تعیین و ثبت شد.

برای مقایسه آماری نتایج، پس از تبدیل داده‌ها به روش سینوس معکوس ریشه دوم ($\arcsin \sqrt{x/100}$) از آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در نرم‌افزار SAS (نسخه 6.12) از روش GLM استفاده شد. در نهایت نیز میانگین‌ها با آزمون توکی با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

شناسایی زنبور پارازیتوئید و باکتری هم‌زیست

ضمن شناسایی گونه جمعیت بابلسر با نام علمی *Trichogramma brassicae* Bezd.، آلودگی باکتریای آن نیز مورد تایید قرار گرفت. توالی‌های مربوط به ژن *wsp* باکتری *Wolbachia* و ناحیه ITS2 زنبور *T. brassicae* آلوده به این باکتری با کدهای FJ441291 و FJ441292 به‌ترتیب برای استرین جدید باکتری (*w*Ba*T.bra*) و زنبور میزبان آن (Tbra-B 11) در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) به ثبت رسیده است (Farrokhi *et al*., 2012).

آزمون واکنش تابعی

نتایج حاصل از رگرسیون لجستیک و مقادیر برآورد شده برای سه قسمت منحنی نسبت تخم‌های پارازیت شده به‌وسیله هر یک از جمعیت‌های زنبور *T. brassicae* در جدول (۱)

منعکس شده است. با توجه به اینکه اعداد برآورد شده برای قسمت Linear منحنی منفی می‌باشد، واکنش تابعی هر سه جمعیت از نوع دوم (II) تعیین شد. منحنی واکنش تابعی جمعیت‌های دوجنسی (B) و آلوده به باکتری (A) و دوجنسی درمان شده با آنتی‌بیوتیک (CB) نسبت به افزایش تراکم تخم میزبان در شکل (۱) و میزان برازش داده‌ها با مدل (r^2 یا ضریب تبیین) در جدول (۲) ارائه شده که نشان می‌دهد مدل به خوبی با داده‌ها برازش یافته است. پراسنجه‌های قدرت جستجو (a) و زمان دستیابی (T_h) برای زنبورهای سه جمعیت A، B و CB به‌ترتیب ۰/۲۳۹۳ h^{-1}، ۰/۷۸۶۲ h؛ ۰/۳۰۱۶ h^{-1}، ۰/۷۶۸٤ h و ۰/۲۵۲۵ h^{-1}، ۰/۷۷۰۱ h به‌دست آمد. همان‌طور که در این جدول مشخص است، صفر در محدوده اطمینان ۹۵ درصد پارامترهای D_a و D_{Th} واقع شده که نشان می‌دهد تیمارها از نظر قدرت جستجو و زمان دستیابی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۱- مقادیر برآورد شده توسط رگرسیون لجیستیک در قسمت‌های مختلف منحنی واکنش تابعی جمعیت‌های ماده‌زا آلوده به باکتری (A) و دوجنسی طبیعی (B) و درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک (CB) زنبور *Trichogramma brassicae* نسبت به افزایش تراکم تخم *Ephestia kuehniella*.

Table 1. Maximum likelihood estimates from logistic regression of the proportion of *Ephestia kuehniella* parasitized eggs by thelytokous PI-*Wolbachia* infected (A), uninfected (B) and cured bisexual (CB) populations of *Trichogramma brassicae* as a function of initial host density.

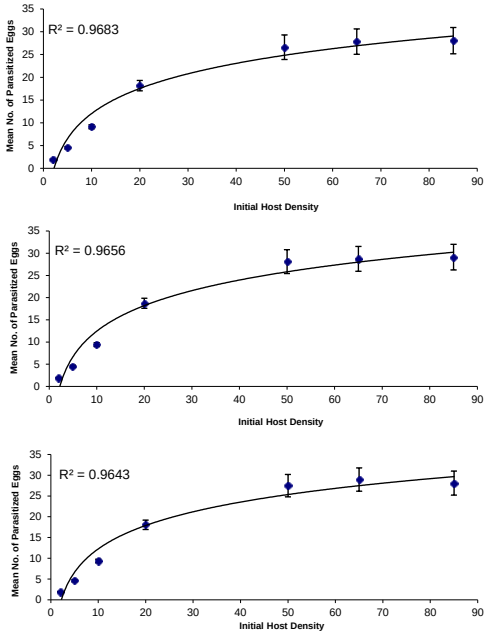
Line/ Population	Coefficient	Estimate	SE	χ^2	P-value
A	P_0 (Constant)	2.9332	0.3557	68	0.0001<
	P_1 (Linear)	-0.0449	0.0290	2.39	0.1218
	P_2 (Quadratic)	-0.00047	0.000647	0.52	0.4689
	P_3 (Cubic)	5.83E-6	4.178E-6	1.95	0.1629
B	P_0 (Constant)	3.2384	0.3938	67.64	0.0001<
	P_1 (Linear)	-0.0426	0.0311	1.88	0.1702
	P_2 (Quadratic)	-0.00067	0.000684	0.96	0.3276
	P_3 (Cubic)	7.47E-6	4.39E-6	2.90	0.0888
CB	P_0 (Constant)	3.5689	0.4047	77.77	0.0001<
	P_1 (Linear)	-0.0882	0.0317	7.74	0.0054
	P_2 (Quadratic)	0.000449	0.000693	0.42	0.5175
	P_3 (Cubic)	-1.22E-8	4.429E-6	0.00	0.9978

جدول ۲- پراسنجه‌های واکنش تابعی جمعیت‌های ماده‌زا آلوده به باکتری (A) و دوجنسی طبیعی (B) و درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک (CB) زنبور *Trichogramma brassicae* نسبت به تراکم‌های مختلف تخم *Ephestia kuehniella*، برآورد شده توسط معادله دیسک.

Table 2. The functional response parameters estimated by the disc equation for thelytokous PI-*Wolbachia* infected (A), uninfected (B) and cured bisexual (CB) populations of *Trichogramma brassicae* in relation to *Ephestia kuehniella* egg densities.

Line/Population	Type	r^2	Parameter	Estimate (M±SE)	Asymptotic 95% CI*	
					Lower	Upper
A	II	0.968	a	0.2393±0.0717	0.0973	0.3813
			T_h	0.7862±0.0323	0.7223	0.8501
			T / T_h	30.52		
B	II	0.966	a	0.3016±0.1263	0.0515	0.5516
			T_h	0.7684±0.0351	0.6989	0.8378
			T / T_h	31.23		
CB	II	0.964	a	0.2525±0.0831	0.0881	0.4170
			T_h	0.7701±0.0332	0.7044	0.8358
			T / T_h	31.16		
A vs B			Da	0.0622±0.1419	-0.3417	0.2172
			DT_h	0.0178±0.0478	-0.0763	0.1119
A vs CB			Da	-0.0132±0.1095	-0.2289	0.2025
			DT_h	0.0161±0.0463	-0.0752	0.1073
B vs CB			Da	0.0490±0.1495	-0.2454	0.3435
			DT_h	-0.00174±0.0483	-0.0969	0.0935

* CI: Confidence Interval



شکل ۱- منحنی واکنش تابعی جمعیت‌های ماده‌زا آلوده به باکتری (A) و دوجنسی طبیعی (B) و درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک (CB) زنبور *Trichogramma brassicae* نسبت به تغییر تراکم تخم *Ephestia kuehniella*. میله‌های نشانه و منحنی‌ها، به‌ترتیب میانگین به‌دست آمده (±SE میانگین) و مقادیر پیش‌بینی شده بر اساس مدل را نشان می‌دهند.

Fig. 1. Functional response curve of thelytokous PI-*Wolbachia* infected (A), uninfected (B) and cured bisexual (CB) populations of *Trichogramma brassicae* in relation to different *Ephestia kuehniella* egg densities. Symbols: observed (mean±SE). Line: predicted by model.

درصد خروج زنبورهای ذخیره‌سازی شده در سرما

تجزیه واریانس کل داده‌ها که ترکیبی از سه عامل جمعیت زنبور (سه جمعیت)، دمای پرورش یافته (۲۰ و ۲۵ درجه) و مدت زمان ذخیره‌سازی (۷-۱ هفته) بود، نشان داد که تیمارها در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($F_{41,168}$=٤١/٣٤؛ P=۰/۰۰۰۱). همچنین تفاوت بین تیمارهای مربوط به هر یک از عوامل نیز معنی‌دار بوده و بین آنها اثر متقابل وجود دارد (P=۰/۰۰۰۱). طبق نتایج بدست آمده در این بررسی، درصد خروج زنبورهای فرم تک‌جنسی آلوده به باکتری (A)، فرم دوجنسی طبیعی (B) و فرم دوجنسی درمان شده با آنتی‌بیوتیک (CB) بدون در نظر گرفتن تاثیر دمای پرورش یافته، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته و هر سه در یک گروه قرار گرفته‌اند (جدول ۳). به لحاظ نظری، بیشترین میزان پارازیتیسم یا حداکثر نرخ حمله توسط جمعیت‌های تک‌جنسی ماده‌زا، دوجنسی طبیعی و دوجنسی درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک به‌ترتیب ۳۰/۵۲، ۳۱/۲۳ و ۳۱/۱٦ تخم میزبان در روز تعیین شد که مقدار عددی این شاخص در جمعیت دوجنسی طبیعی (B) بیشتر از دو جمعیت CB و A می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۳- درصد تفریخ تخم‌های پارازیت شده *Ephestia kuehniella* توسط جمعیت‌های ماده‌زا آلوده به باکتری (A) و دوجنسی طبیعی (B) و درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک (CB) زنبور *Trichogramma brassicae* پس از ذخیره‌سازی در شرایط سردخانه (SE ± میانگین).

Table 3. The hatching rate of *Ephestia kuehniella* parasitized eggs by thelytokous PI-*Wolbachia* infected (A), uninfected (B) and cured bisexual (CB) populations of *Trichogramma brassicae* after cold storage period (M±SE).

Population (Rearing temperature)	Storage time (day)							Total Mean
	7	14	21	28	35	42	49	
A (20°C)	87.76±0.68^{a}	85.1±0.71^{ab}	86.72±0.33^{ab}	78.38±1.3^{ab}	75.52±2.46^{bc}	58.16±6.24^{cd}	49.74±3.05^{cde}	74.48A
A (25°C)	88.62±1.22^{a}	74.72±4.03^{bc}	46.54±2.82^{de}	42.72±4.18^{def}	40.6±4.78^{def}	35.34±3.74^{ef}	14.86±1.16^{g}	49.05B
B (20°C)	90.42±2.2^{a}	89.26±1.44^{a}	88.56±1.8^{a}	77.74±1.74^{ab}	74.4±3.57^{bc}	49.7±6.25^{cde}	47.14±3.98^{de}	73.89A
B (25°C)	88.20±1.57^{a}	67.76±5.81^{c}	52.94±5.19^{de}	47.74±5.35^{de}	43.28±4.47^{def}	41.04±1.65^{def}	34.1±3.71^{ef}	53.58B
CB (20°C)	87.12±1.03^{ab}	85.32±0.97^{ab}	88.46±1.08^{a}	76±2.75^{bc}	74.94±2.9^{bc}	57.52±3.87^{cd}	49.22±3.87^{cde}	74.14A
CB (25°C)	88.82±1.37^{a}	66.28±5.7^{cd}	48.24±2.2^{cde}	41.52±5.29^{ef}	35.52±2.53^{ef}	32.84±4.33^{ef}	27.14±1.85^{f}	48.62B
Total mean	84.4A	78.07B	68.57C	60.75D	57.37E	45.7F	37.03G	-

Note: Means followed by the same upper case small letters within a column are not significantly different by Tukey's test (P<0.01); Means followed by the same capital letters within a row or column are not significantly different by Tukey's test (P<0.05).

همچنین نتایج نشان می‌دهد که در هر سه جمعیت، دمایی که زنبور قبل از ذخیره‌سازی در آن پرورش یافته، نقش بسیار مهمی در میزان خروج داشته و به‌ویژه از هفته سوم به بعد تفاوت آنها معنی‌دار بوده و از نظر گروه‌بندی از یکدیگر متمایز شده‌اند. در مجموع پس از ۴۹ روز ذخیره‌سازی، در بین تیمارها جمعیت A (آلوده به *Wolbachia*) که در ۲۰ درجه سلسیوس پرورش یافته بود، از نظر عددی دارای بالاترین درصد خروج (۴۹/۷۴ ± ۳/۰۵) ، و بالعکس، جمعیت A پرورش یافته در ۲۵ درجه سلسیوس کمترین درصد خروج (۱/۱۶ ± ۱۴/۸۶) را به خود اختصاص داده است (جدول ۳).

بحث

در گونه‌های خاصی از زنبور تریکوگراما، آلودگی به *Wolbachia* به سمت تثبیت و همگانی شدن سوق می‌یابد، در چنین جمعیت‌هایی (fixed population) مانند گونه *Trichogramma cordubensis* Vargas and Cabello در نهایت تمام افراد آلوده خواهند شد به نحوی که فقط زنبور ماده‌زا (thelytokous) حضور دارند (Stouthamer, 1997). در تعداد دیگری از گونه‌ها، مانند *T. brassicae* بخش کوچکی از جمعیت به باکتری ولباکیا آلوده شده و به‌صورت هم‌زمان افراد آلوده و غیرآلوده در جمعیت حضور داشته و تبادل ژنتیکی بین دو زیرجمعیت مختلط (mixed population) به‌وجود خواهد آمد (Stouthamer & Kazmer,1994).

به‌نظر می‌رسد استرین‌هایی از باکتری که وابسته به جمعیت‌های تثبیت شده هستند در بسیاری از زمینه‌ها دارای جنبه‌های تکاملی با میزبان‌هایشان می‌باشند (Huigens, 2003; Almeida, 2004). در جمعیت مختلط تعارض هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها به‌صورت یک توان بالقوه وجود دارد، درحالی‌که در جمعیت تثبیت شده دیگر چنین تعارضی دیده نمی‌شود و این روند تکاملی بین دو گونه به لحاظ تأثیر نیروهای انتخاب طبیعی در جهت کاهش اثرات منفی و تقویت رابطه مثبت پیش می‌رود (Price, 1997). در چنین جمعیت‌هایی (fixed) اثر منفی باکتری بر شایستگی (fitness) میزبان کاسته می‌شود (Silva, 1999; Meer, 1999; Huigens & Stouthamer, 2003; Huigens, 2003).

در ایران، زنبور *T. brassicae* در مقایسه با سایر گونه‌ها از فراوانی و گسترش بیشتری برخوردار بوده و به‌عنوان گونه غالب معرفی شده است، به‌نحوی که برای رهاسازی در مزارع ذرت و برنج، در اغلب انسکتاریوم‌های کشور از این گونه به‌عنوان زنبور مادری استفاده می‌شود (Ebrahimi *et al*., 1998). بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط Farrokhi (2010) درصد آلودگی به باکتری ولباکیا در جمعیت *T. brassicae* جمع‌آوری شده از بابلسر، به‌میزان ۴۹/۵ درصد و دارای حالت حد واسط بین جمعیت‌های مختلط و تثبیت شده (mixed و fixed) می‌باشد. لذا تکمیل برخی از آزمایشاتی که توسط Farrokhi *et al*. (2010b) روی جمعیت *T. brassicae* ماده‌زا انجام شده بود، با افزودن جمعیت دوجنسی حاصل از تیمار انتی‌بیوتیک و تغییر در میزبان آزمایشگاهی ضروری به نظر رسید.

مطالعه واکنش تابعی برای مقایسه کارایی گونه‌ها یا جمعیت‌های مختلف، آزمایش مناسبی محسوب می‌شود (Overholt & Smith, 1990) که در عین حال اطلاعاتی را در مورد قدرت میزبان‌یابی دشمن طبیعی مورد نظر تأمین نماید (Munyaneza & Obrycki, 1997). نحوه تجزیه و تحلیل داده‌ها و انتخاب مدل مناسب نقش بسیار مهمی در به‌دست آوردن هر چه دقیقتر نتایج خواهد داشت. در این بررسی با توجه به اینکه بر اساس معادله جستجوی تصادفی (مدل Rogers) پارامترهای برآورد قدرت جستجو (a) و زمان دستیابی (T_h)، منفی به دست آمدند، از روش رگرسیون غیرخطی و رگرسیون لجستیک برای معنی‌دار بودن پارامترهای مزبور استفاده شد. مانند اغلب گزارش‌هایی که تا پیش از این در مورد زنبورهای *Trichogramma* در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد، در این بررسی نیز برای هر سه جمعیت آلوده و غیرآلوده به باکتری زنبور *T. brassicae*، واکنش تابعی نوع II به‌دست آمد. برخی مطالعات انجام شده روی جمعیت‌های بومی زنبور *T. brassicae* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، واکنش نوع II را نسبت به تخم بید غلات نشان

داده‌اند (Karimian, 1998; Moezipour *et al*., 2008) پیش از این تحقیق، واکنش تابعی زنبور تریکوگرامای آلوده به باکتری *Wolbachia* نسبت به تخم بید غلات (*Sitotroga cereallela* Oliv.) از نوع دوم تعیین شد (Farrokhi *et al*., 2010b). در این پژوهش، زمان دستیابی و قدرت جستجوی جمعیت ماده‌زا و جمعیت‌های دوجنسی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما در بررسی Farrokhi *et al*. (2010b) زمان دستیابی جمعیت ماده‌زا به‌طور معنی‌داری طولانی‌تر از جمعیت دوجنسی طبیعی برآورد شد که علت آن به تفاوت در جثه زنبورهای آلوده نسبت داده شده است. در این بررسی، همان‌طور که اشاره شد حداکثر نرخ حمله توسط جمعیت‌های تک‌جنسی ماده‌زا (A) و دوجنسی طبیعی (B) بدون تفاوت معنی‌دار، به‌ترتیب ۳۰/۵۲ و ۳۱/۲۳ تخم افستیا در روز تعیین شد که با نتایج Farrokhi *et al*. (2010b) (۳۸/۰۵ و ۵۷/۵۵) تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. با توجه به یکسان بودن جمعیت‌ها و شرایط محیطی این دو آزمایش، علت اختلاف به تفاوت دو گونه میزبان واسط استفاده شده در این دو آزمایش، یعنی سیتوتروگا و افستیا مرتبط می‌باشد. در مجموع تفاوت در این پراسنجه‌ها که برای یک گونه حشره برآورد می‌شود، می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند گیاه میزبان، دما و نوع طعمه یا میزبان باشد (Juliano & Williams, 1985; Coll & Ridgway, 1995; Runjie *et al*., 1996; Wang & Ferro, 1998; Messina & Hanks, 1998; Mohaghegh *et al*., 2001; Moezipour *et al*., 2008).

به لحاظ کاربردی، ذخیره‌سازی *Trichogramma* اهمیت بسیار زیادی در توسعه کاربرد این زنبور پارازیتوئید تخم دارد. خوشبختانه در این خصوص مطالعات زیادی برای ذخیره‌سازی کوتاه مدت و بلند مدت زنبور تریکوگراما در سرما انجام شده که برای گونه‌های مختلف، امکان ذخیره‌سازی زنبور در مراحل تخم، لارو، پیش‌شفیره و شفیره به‌مدت ۲ هفته الی ٤ ماه در دماهای ۱۳-۲ درجه، به‌صورت ساده (یک مرحله‌ای) و یا با القاء دیاپوز (دو مرحله‌ای) وجود دارد (برگرفته از: Cherif *et al*., 2021 و Zang *et al*., 2021؛ Hadaegh, 2005).

نتایج بررسی انجام شده توسط Shi *et al*. (1993) در زمینه تأثیر القاء دیاپوز و ذخیره‌سازی بلند مدت دو اکوتیپ از زنبور *Trichogramma dendrolimi* Matsumura، نشان دهنده تأثیر شرایط محیطی بر میزان حساسیت زنبور نسبت به سرما بود. به‌نحوی که اکوتیپ نواحی سردسیر شمال چین، حساسیت کمتر و قدرت تولیدمثل بالاتری را در مقایسه با اکوتیپ جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی چین از خود نشان داد. در این پژوهش نیز گرچه ظاهراً باکتری *Wolbachia* پس از ذخیره‌سازی زنبورهای *T. brassicae* پرورش یافته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باعث کاهش درصد خروج آنها شد، اما چنانچه قبل از ذخیره‌سازی، زنبورهای ماده‌زا برای چند نسل در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پرورش داده شوند، نه تنها اثر منفی روی درصد خروج زنبور مشاهده نمی‌شود، بلکه میانگین عددی درصد خروج زنبورهای لاین ماده‌زا (A) پس از ٤۹ روز از جمعیت‌های دوجنسی (B و CB) بیشتر بود (جدول ۳) که می‌تواند نشان دهنده بالا رفتن تحمل به سرما در اثر افزایش غلظت و تراکم باکتری *Wolbachia* در بدن حشره میزبان باشد. نتایج به‌دست آمده توسط Farrokhi (2010) در این زمینه کاملا با نتایج این پژوهش هم‌خوانی و مشابهت دارد. تاکنون بررسی‌های به‌عمل آمده در زمینه تأثیر باکتری *Wolbachia* بر درصد خروج زنبور-های آلوده‌ای که در دماهای پائین ذخیره شده یا به دیاپوز رفته-اند، نه تنها اثرات سوء و زیان‌باری را نشان نداده بلکه برخی گزارش‌ها به لحاظ کاربردی و امکان ذخیره‌سازی جمعیت‌های تک‌جنسی، حاوی نکات مثبتی هستند. بنا به اظهار Wang & Smith (1996) جمعیت‌های ماده‌زای *Trichogramma minutum* Riley در مقایسه با جمعیت‌های دوجنسی بهتر می‌توانند دماهای پائین را تحمل کنند. همچنین این جمعیت‌ها آستانه حرارتی پائین‌تری را برای رشد و نمو از خود نشان داده‌اند و از طرفی نیز درصد خروج آنها پس از گذراندن یک دوره ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سلسیوس تا حدی بیشتر بوده است. Pintureau *et al*. (2003) نیز با بررسی اثرات جانبی این باکتری بر دیاپوز زنبور *Trichogramma evanescens* Westwood که از

یک اقلیم گرم مدیترانه‌ای جمع‌آوری شده بود، هیچ نوع تأثیر مثبت و یا منفی بر نرخ خروج زنبورهای ذخیره‌سازی شده یا میزان باروری آنها مشاهده نکردند و در نهایت هم استفاده از جمعیت‌های تک‌جنسی آلوده به باکتری را به‌ویژه از نظر افزایش راندمان تولید و کاهش هزینه‌ها قابل توصیه دانستند. از این نتایج می‌توان این گونه برداشت کرد که این باکتری هم‌زیست قادر به افزایش قدرت بقاء میزبان در طول فصل سرما می‌باشد.

با وجود برخی نظرات مبنی بر حذف باکتری ولباکیا از پرورش کلنی تریکوگراما به‌دلیل برخی اثرات منفی آن بر شاخص‌های زیستی زنبور میزبان (برگرفته از:Zang *et al*., 2021)، نتایج این بررسی و پژوهش‌های قبلی، نشان داد با وجود مشاهده برخی اثرات منفی باکتری بر میزبان خود، تفاوت آماری بین جمعیت‌های ماده‌زای آلوده به باکتری و دوجنسی به لحاظ پراکنش، جستجوگری، پارازیتیسم، باروری و طول عمر دیده نشده و از لحاظ کاربردی نتایج حاکی از کارایی بیشتر فرم ماده‌زا در شرایط گلخانه و مزرعه بوده است (Silva, 1999; Miura & Tagami, 2004; Hohmann *et al*., 2001b; Grenier *et al*., 2002; Farrokhi, 2010; Hosseini, 2011, Farrokhi *et al*., 2023). همچنین اخیراً Ebrahimi *et al.* (2019) با انجام مطالعاتی، به‌گزینی لاین نوترکیب تک‌جنسی زنبور *Trichogramma pretiosum* Riley آلوده به باکتری *Wolbachia* را برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک کاربردی پیشنهاد نموده‌اند.

آنچه در اینجا می‌توان پیشنهاد نمود، لزوم بررسی بیشتر در یافتن گونه‌های جدید آلوده در شرایط مختلف آب و هوایی به‌ویژه در ارتفاعات است که شرایط مناسب‌تری برای تثبیت باکتری در میزبان خود وجود دارد. همچنین بررسی انتقال افقی باکتری *Wolbachia* به‌منظور ارتقاء کیفیت سوش‌هایی از تریکوگراما که از قابلیت‌های خاصی برخوردار است (مانند عدم حساسیت کم‌تر به خشکی و گرما یا قدرت پرواز و جستجوی بالا) و مقایسه شاخص‌های زیستی آن با جمعیت دوجنسی و غیرآلوده از همان اکوتیپ، تا با آگاهی بیشتر نسبت به حذف اثرات احتمالی نامطلوب میکروارگانیسم‌های هم‌زیست برنامه‌ریزی نمود.

سپاسگزاری

این مقاله براساس نتایج پایان‌نامه نویسنده دوم، دانشجو کارشناسی ارشد واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و با استفاده از تجهیزات و فضای پژوهشی بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک موسسه گیاه‌پزشکی تهیه شده است که بدین‌وسیله از مدیران محترم موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و گروه گیاهپزشکی واحد علوم و تحقیقات قدردانی می‌شود. همچنین همکاری استاد ارجمند، جناب آقای دکتر ابراهیم ابراهیمی برای شناسایی و تأیید نام علمی نمونه‌های زنبور تریکوگراما شایسته تقدیر می‌باشد.

References

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.

BALE, J.S., J.C. VAN LENREREN, F. BIGLER, 2008. Biological control and sustainable food production. Philosophical of the Transactions Royal Society B., 363: 761-776.

AESCHLIMANN, J.P. 1990. Simultaneous occurrence of thelythoky and bisexuality in hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. Entomophaga 35: 3-5.

ALLAHYARI, H., P. AZMAYESHFARD, J. NOZARI, 2004. Effects of host on functional response of offspring in two populations of *Trissolcus grandis* on the sunn pest. Journal of Applied Entomology 128: 39-43.

CHERIF, A., R. MANSOUR, K. GRISSA-LEBDI, 2021. The egg parasitoids *Trichogramma*: from laboratory mass rearing to biological control of lepidopteran pests. Biocontrol Science and Technology, 31(7): 661-693.

COLL, M., R.L. RIDGWAY, 1995. Functional and numerical response of *Orius insidiusus* (Heteroptera: Anthocoridae) to its prey in different vegetable crops. Annals of the Entomological Society of America, 88: 732-738.

DE CLERCQ, P., J. MOHAGHEGH, L. Tirry, 2000. Effect of host plant on the functional response of the predator *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Biological Control, 18: 65-70.

EBRAHIMI, V., A. ASHOURI, P.F. RUGMAN-JONES, A.R.I. LINDSEY, M. JAVAN-NIKKHAH, R. STOUTHAMER, 2019. Using parthenogenesis-inducing *wolbachia* for the selection of optimal lines of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* for use in biocontrol. Entomologia Experimentalis et Applicata, 167: 241-251.

EBRAHIMI, E., B. PINTUREAU, M. SHOJAI, 1998. Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. Applied Entomology and Phytopathology, 66 (1&2): 39-43. (In Persian with English summary)

FARROKHI, S. 2010. Evaluation of the affect of *Wolbachia* on some biological characteristics of a *Trichogramma brassicae* thelytokous population. Ph.D. thesis. University of Tehran, Iran. (in Persian with English summary)

FARROKHI, S., A. ASHOURI, M.E. HUIGENS, P. VERBAARSCHOT, 2010a. Horizontal transmission of *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps (Hym., Trichogrammatidae). Iranian Journal of Plant Protection Science, 41(2): 315-325.

FARROKHI, S., A. ASHOURI, J. SHIRAZI, H. ALLAHYARI, M.E. HUIGENS, 2010b. A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. Insect science jornal, 10: 167.

FARROKHI, S., H. DADPOUR MOGHANLOO, J. SHIRAZI, M.R. ATTARAN, 2023. Evaluation of asexual *Wolbachia*-infected *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) performance in greenhouse and field conditions. Journal of Entomological Society of Iran, 43(1): 1-10.

FARROKHI, S., HUIGENS, M.E., R. ZARE, P. VERBAARSCHOT, 2012. Detection of *Wolbachia* bacterium in Iranian strain of *Trichogramma brassicae* (Hym., Trichogrammatidae). Journal of Entomological Society of Iran, 32(2): 49-69.

FARROKHI, S., J. SHIRAZI, M.R. ATTARAN, 2013. *Wolbachia* effect on olfactory responses and parasitism rate of *Trichogramma brassicae* in laboratory conditions. Biocontrol in Plant Protection, 1(1): 65-79.

GRENIER, S., S.M. GOMES, B. PINTUREAU, F. LASSABLIERE, P. BOLLAND, 2002. Use of tetracycline in larval diet to study the effect of *Wolbachia* on host fecundity and clarify taxonomic status of *Trichogramma* species in cured bisexual lines. Journal of Invertebrate Pathology, 80: 13-21.

HADAEGH, M. 2005. Effect of short storage on some biological and quality characteristics of *Trichogramma brassicae* Bezd. In two pupal stages and different temperatures. MSc. thesis. Isfahan University of Technology, Iran. (in Persian with English summary)

HASSAN, S.A. 1990. A simple method to select effective *Trichogramma* strains for use in biological control. In: *Trichogramma* and other egg parasitoids (Eds. WAJNBERG, E. and VINSON, S.B.), pp. 201–205. Les Colloques de l'INRA 56.

HASSEL, M.P. 1978. The dynamics of arthropod predatory-prey systems. Princeton University Press.

HOHMANN, C.L., R.F. LUCK, 2000. Effect of temperature on the development and thermal requirements of *Wolbachia*-infected and antibiotically cured *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil, 29: 497-505.

HOHMANN, C.L., R.F. LUCK, R. STOUTHAMER, 2001. Effect of *Wolbachia* on the survival and reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Neotropical Entomology, 30(4): 607-612.

HOSSEINI, F. 2011. Evaluation of some biological characteristics and applied aspects of a *Trichogramma brassicae* thelytokous population in the laboratory and field conditions. M.Sc. thesis. Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry. Islamic Azad University Science and Research Branch, Iran.73 pp. (in Persian with English summary)

HUIGENS, M.E. 2003. On the evolution of the *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Trichogramma* wasps. Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands. 183 pp.

HUIGENS, M.E., R.F. LUCK, R.H.G. KLAASSEN, M.F.P.M. MAAS, M.J.T.N. TIMMERMANS, R. STOUTHAMER, 2000. Infectious parthenogenesis. Nature, 405: 178-179.

HUIGENS, M.E., R. STOUTHAMER, 2003. Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. In: Insect symbiosis (Eds. K. BOURTZIS and T.A. MILLER), pp. 247-266. CRC Press.

JULIANO, S.A. 2001. Nonlinear curve fitting: predation and functional curves. *In*: Design and analysis of ecological experiments, 2nd edn (Eds. S.M. Cheiner and J. Gurven), pp. 159–182. Chapman & Hall.

JULIANO, S.A., F.M. WILLIAMS, 1985. On the evolution of handling time. Evolution, 39: 212-215.

KARIMIAN, Z. 1998. Bioecology of *Trichogramma brassicae* in paddy fields of Guilan province. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture. University of Guilan, Iran, 99 pp. (in Persian with English summary)

KAZMER, D.J., R.F. LUCK, 1995. Size fitness relationships in a field population of the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. Ecology, 76: 412-425.

KISHANI FARAHANI, H., A. ASHOURI, S.H. GOLDANSAZ, S. FARROKHI, A. AINOUCHE, J. VAN BAAREN, 2015. Does *Wolbachia* infection affect decision-making in a parasitic wasp? Entomologia Experimentalis et Applicata, 155: 102–116.

LI, S.Y., D.E. HENDERSON, J.H. MYERS, 1994. Selection of suitable *Trichogramma* species for potential control of the blackheaded fireworm infesting cranberries. Biological Control, 4: 244-248.

MEER, VAN M.M.M., F. VAN KAN, STOUTHAMER, R. 1999. Spacer 2 region and 5S rDNA variation of *Wolbachia* strains involved in cytoplasmic incompatibility or sex ratio distortion in arthropods. Letters in Applied Microbiology, 28: 17-22.

MESSINA, F.J., J.B. HANKS, 1998. Host plant alters the shape of the functional response of an aphid predator (Coleoptera: Coccinellidae). Environmental Entomology, 27: 1196-1202.

MIURA, K., Y. TAGAMI, 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.

MOEZIPOUR, M., M. KAFIL, H. ALLAHYARI, 2008. Functional response of *Trichogramma brassicae* at different temperatures and relative humidities. Bulletin of Insectology, 62(2): 245-250.

MOHAGHEGH, J., P. DE CLERCQ, L. TIRRY, 2001. Functional response of the predators *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) to the beet armyworms, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep., Noctuidae): effect of temperature. Journal of Applied Entomology, 125: 131-134.

MUNYANEZA, J., J.J. OBRYCKI, 1997. Functional response of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinelidae) to Colorado potato beetle eggs (Col., Chrysomelidae). Biological Control, 8: 215-224.

NAZERI, M., A. ASHOURI, M. HOSSEINI, 2015. Can *Wolbachia* infection improve qualitative characteristics of *Trichogramma brassicae* reared on cold stored eggs of the host? International Journal of Pest Management, 61(3): 243-249.

OVERHOLT, W.A., SMITH, Jr. 1990. Comparative evaluation of three exotic insect parasites (Hymenoptera: Braconidae) against southwestern corn borer (Lep., Pyralidae) in corn. Environmental Entomology, 19: 345-356.

PINTUREAU, B., GRENIER, S., A. HEDDI, H. CHARLES, 2002. Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae). Annales de la Société Entomologique de France (n.s.), 38(4): 333-338.

PINTUREAU, B., J. PIZZOL, P. BOLLAND, 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.

RUNJIE, Z., K.L. HEONG, I.T. DOMINGO, 1996. Relationship between temperature and functional response in *Cardiochiles philippinensis* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Environmental Entomology, 28: 1321-1324.

SHI, Z.H., S.S. LIU, W.L. XU, J.H. HE, 1993. Comparative studies on the biological characteristics of geographic/host populations of *Trichogramma dendrolimi* in China. III. Response to temperature and humidity. China Journal of Biological Control, 9: 97-101.

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., M.M.M. VAN MEER, M.M. ROSKAM, A. HOOGENBOOM, G. Gort, R. STOUTHAMER, 2000. Biological control potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: Laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strains. Biocontrol Science and Technology, 10: 223-238.

STOUTHAMER, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction (Eds. O'NEILL, S.L., A.A. HOFFMANN, WERREN J.H.), pp. 102-124. Oxford University Press, Oxford.

STOUTHAMER, R. 2003. The use of unisexual wasps in biological control. In: Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures (Ed. VAN LENTEREN, J.C.), pp. 93–113. CABI Publishing, Wallingford.

STOUTHAMER, R., J.A.J. BREEUWER, G.D.D. HURST, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology, 53: 71-102.

STOUTHAMER, R., D.J. KAZMER, 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. Heredity, 73: 317-327.

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

TAGAMI, Y., K. MIURA, R. STOUTHAMER, 2001. How does infection with parthenogenesis-including *Wolbachia* reduce the fithness of *Trichogramma*? Invertebrate pathology, 78: 267-271.

TAGAMI, Y., K. MIURA, R. STOUTHAMER, 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.

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

WANG, Z., S.M. SMITH, 1996. Phenotypic differences between thelytokous and arrhenotokous *Trichogramma minutum* from *Zeiraphera canadensis*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 78: 315-323.

ZANG, L.S., S. WANG, F. ZHANG, N. DESNEUX, 2021. Biological control with *Trichogramma* in China:

History, present status, and perspectives. Annual Review of Entomology, 66: 463-484.