آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۸، شماره ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۹

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

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

ابراهیم ابراهیمی
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: ماده‌زایی، *Wolbachia*، زنبور تریکوگراما

مقدمه

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

.(Stouthamer *et al.*, 1990a)

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

۱- منشاء ژنتیکی

۲- وجود میکروارگانیزم‌های هم‌زیست

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

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

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

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

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

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

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

روش بررسی

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

زنبورهای مورد مطالعه روی تخم پروانهٔ بید آرد (*Ephesia kuehniella*)، داخل لوله‌های شیشه‌ای به قطر یک و طول ده سانتیمتر در دمای c ۱° ± ۲۴، رطوبت نسبی حدود ۷۰٪ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند و زنبورهای زندهٔ بالغ نسل سوم (F3) به دمای ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.

برای جداسازی DNA از روش Chelex DNA Isolation Protocol استفاده شد (Van Kan *et al.*, 1996 و روش کار انستیتوی ملی علوم کاربردی، لیون، فرانسه، منتشر نشده). ابتدا به تعداد نمونه‌ها، لوله‌های اپندرف (Ependorf) در نظر گرفته و در هر کدام ۴۰ میکرولیتر محلول Chelex ریخته شد، سپس از هر جمعیت ۱۰ تا ۲۰ حشره کامل به لوله‌های محتوی Chelex منتقل شده و با میلهٔ شیشه‌ای له گردیدند، به گونه‌ای که رنگ شفاف محلول تیره شد. پس از آن به هر لوله ۱/۵ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شد و پس از بهم زدن و سانتریفوژ کوتاه مدت (حدود ۵ ثانیه)، لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای °c ۵۶ و به دنبال آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °c ۹۶ قرار داده شدند. سپس ۲ میکرولیتر از DNA عصاره گیری شده به ۲۳ میکرولیتر از محلول مادر (Master mix) مرکب از مواد زیر برای هر لوله افزوده شد:

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

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

در مرحلهٔ بعد لوله‌ها در ماشین PCR قرار گرفته و برنامه به‌صورت زیر تنظیم گردید:

4´ 94 °c, 35* (30" 97 °c , 45" 51 °c, 45" 72 °c) ,Cooldown 10 °c

[۴ دقیقه در ۹۴°c و به دنبال آن ۳۵ بار چرخهٔ داخل پرانتز: (۳۰ ثانیه در °c ۹۷، ۴۵ ثانیه در c °۵۱، ۴۵ ثانیه در °c ۷۲) و پس از آن ۵ دقیقه در °c ۷۲ و خنک شدن نهائی تا °c ۱۰].

پس از پایان کار دستگاه PCR، به هر نمونه ۵ میکرولیتر بروموفنل افزوده شد و ۲۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه و بروموفنل داخل هر چاهک ژل آگارز جهت انجام الکتروفورز افقی قرار گرفت.

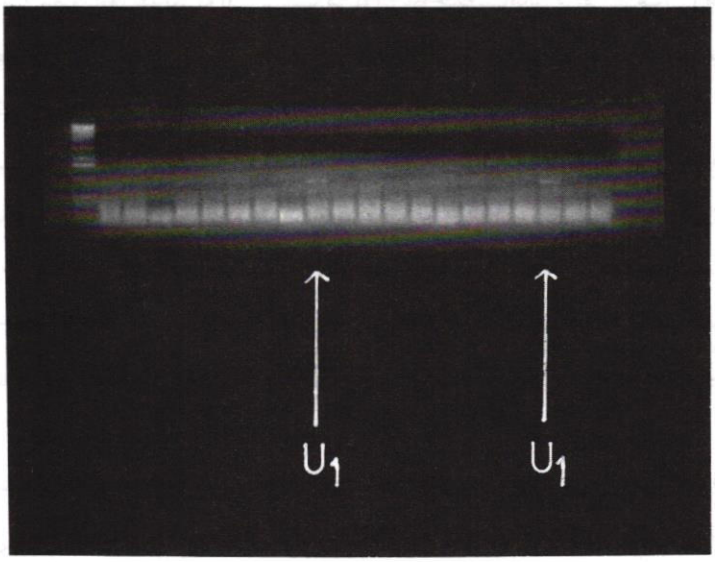
برای ساختن ژل آگارز، ۱/۵ گرم آگارز با ۱۵۰ میلی لیتر محلول TEA (Tris Ethyl Amid) مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه داخل آون حرارت داده شد. پس از خنک شدن (در حرارت اتاق) مقدار ۷۵ میکرولیتر اتیدیم بروماید (Ethidium bromide) جهت رنگ‌آمیزی به آن افزوده شد (اتیدیم بروماید باید پس از خنک شدن محلول افزوده شود چون دارای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

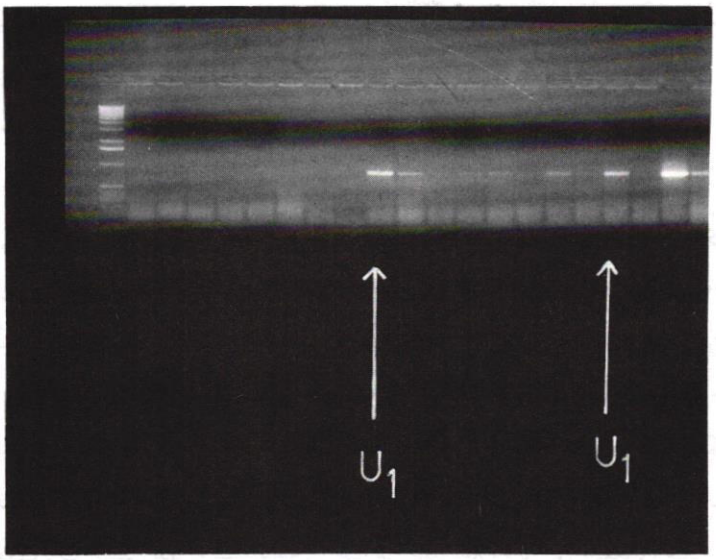
در صورت وجود *Wolbachia* در نمونه‌های مورد آزمایش، در اثر جفت شدن رشته مورد نظر از DNA با پرایمرهای خاص آن و افزایش آن در اثر ازدیاد متوالی و تصاعدی طی مراحل PCR، باندهای مربوطه روی ژل مشخص خواهند بود.

نتیجه و بحث

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

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





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

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