آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۶، شماره‌های ۲ و ۱، ۷۷-۱۳۷۶

مطالعه مرفولوژیک و آنزیماتیک گونه‌های جنس *Trichogramma* در ایران

Morphological and Enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran.
(Hym. Trichogrammatidae)

ابراهیم ابراهیمی، برنارد پنتورو و محمود شجاعی
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، آزمایشگاه بیولوژی انستیتوی ملی علوم کاربردی، لیون، فرانسه و واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

چکیده

در این مقاله ۸ گونه از زنبورهای جنس *Trichogramma* Westwood, 1833 از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری و شناسائی شده و ضمن معرفی میزبان‌ها و پراکندگی هر گونه، مشخصات مرفولوژیک و آنزیماتیک هر یک ذکر شده و کلیدی جهت تشخیص گونه‌های معرفی‌شده ارائه گردیده است. مطالعه آنزیم استراز با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل‌پلی‌آکریل‌آمید انجام شده و برای مطالعه مرفولوژیک عمدتاً از مشخصات دستگاه زادآوری و شاخک نر استفاده گردیده است. گونه‌های معرفی شده عبارتند از:

Trichogramma brassicae Bezdenko, *T. evanescens* Westwood, *T. embryophagum* (Hartig), *T. dendrolimi* Matsumura, *T. semblidis* (Aurivillius) ,*T. principium* Sugonjaev & Sorokina, *T. tshumakovae* Sorokina, *T. pintoi* Voegelé.

۳ گونه از این مجموعه برای فون ایران جدید می‌باشند. مطالعه آنزیمی جهت تعیین فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها و انجام لقاح‌های بیولوژیک بین آنها ادامه دارد.

مقدمه

خانوادهٔ Trichogrammatidae دارای ۸۰ جنس است که بزرگترین جنس آن *Trichogramma* با بیش از ۱۴۵ گونهٔ شناخته شده‌است. این جنس دارای انتشار وسیع در سطح جهان است و در اکوسیستم‌های مختلف یافت می‌شود، چنانکه Pinto & Stouthamer (1944) معتقدند که هیچ

سرزمین غیر یخبندانی که عاری از تریکوگراما باشد شناخته نشده است. اگرچه این زنبورها تخم حشرات راسته‌های گوناگون نظیر Coleoptera، Diptera، Hemiptera، Homoptera، (Symphyta) Hymenoptera و Neuroptera را مورد حمله قرار می‌دهند، اما میزبانهای آنها عمدتاً از راستهٔ Lepidoptera بوده و یکی از رایج‌ترین عوامل زنده مورد استفاده در کنترل بیولوژیک پروانه‌ها در سراسر جهان می‌باشند، بطوریکه در شوروی سابق در سال ۱۹۹۰ در سطحی معادل ۲۷/۶ میلیون هکتار از این زنبور استفاده گردیده که بزرگترین سطح استفاده از یک عامل بیولوژیک در جهان است. چین با ۲/۱ میلیون هکتار و مکزیک با ۲ میلیون هکتار دومین و سومین میزان کنترل با این زنبور را داشته‌اند. به گزارش Hassan (1988, 1990) و دیگران (نقل از Li, 1994) سالانه بیش از ۳۲ میلیون هکتار از اراضی زراعی و جنگلی در بیش از ۳۰ کشور جهان با زنبور تریکوگراما کنترل می‌شوند. این کنترل عمدتاً در محصولاتی نظیر ذرت، نیشکر، پنبه، گوجه‌فرنگی، کلم، سیب، چغندرقند، برنج، سویا، انگور، توتون، مرکبات و فراورده‌های انباری بوده است. در ایران از زنبور تریکوگراما عمدتاً در شالیزارهای شمال کشور علیه پروانه کرم ساقه‌خوار برنج استفاده شده و همچنین علیه پروانه‌های زیان‌آور ذرت، انار و سیب در شمال، مرکز و شمال‌غرب ایران فعالیت‌هائی صورت گرفته‌است که در صورت پیگیری و اجرای علمی و صحیح، نقش زیادی در کنترل آفات و کاهش مصرف سموم شیمیائی خواهد داشت.

کنترل بیولوژیک توسط زنبور تریکوگراما را می‌توان با استفاده از گونه‌هائی که سازگاری مناسب در محیط فعالیت آفت دارند به کیفیت مطلوب رساند. شناسائی این زنبورها به علت اندازه کوچک (کمتر از ۱ میلیمتر) و فقدان خصوصیات مرفولوژیک متفاوت بین گونه‌ها مشکل است، در عین حال شناسائی صحیح گونه‌ها بسیار اساسی است زیرا رهاسازی گونهٔ نامناسب سبب کنترل بیولوژیک با تأثیر کم‌شده و قیمت تمام‌شده محصول را در یک تولید اقتصادی بالا برده و خسارت به محصول افزایش می‌یابد و در نهایت استفاده بیشتر از سموم شیمیائی را موجب می‌شود. خصوصیات مرفولوژیک متفاوت نظیر اندازه، رنگ، شکل بال، شکل شاخک‌ها و پاها، موهای بال و شاخک و غیره برای تمایز گونه‌های جنس *Trichogramma* بکار برده شده‌اند. اولین کسی که دستگاه زادآوری تریکوگراما را توصیف کرد Hintzelmann در سال ۱۹۲۵ بود اما تا قبل از مقالهٔ Nagarakatti & Nagaraja (1971) اهمیت دستگاه زادآوری نر در شناسائی گونه‌های تریکوگراما مورد توجه قرار نگرفته بود. اندازهٔ تخم‌ریز، شکل فراگما و خصوصیات بیولوژیک بوسیله Telenga (1958)، موهای شاخک ماده بوسیله Voegelé, *et al.* (1975)، آنزیم‌ها بوسیله Voegelé & Bergé (1976)، موهای Mesoscutellar بوسیله Pinto *et al.* (1978) و آنالیز چند متغیره مرفومتریک بوسیله Russo & Pintureau (1981) بکار گرفته شده‌اند.

Voegele & Pintureau (1982) کلیدی بر اساس آلت زادآوری نر و شاخک تهیه کرده و گونه‌های تریکوگراما را به ۱۴ گروه تقسیم‌بندی کردند. Pintureau (1994) کلیدی بر اساس مشخصات دستگاه زادآوری و شاخک‌های نر و آنزیم استراز ارائه کرده‌است. خیلی از این خصوصیات مرفولوژیک در سیستماتیک جنس *Trichogramma* مفید هستند اما اغلب آنها در جمعیت‌ها متغیر بوده و معیار خوبی برای تفکیک گونه‌ها نمی‌باشند، هر چند در مجموع به شناسائی گونه‌ها کمک می‌کنند. استفاده از نسبت بین اعضای مختلف بدن مانند نسبت طول تخم‌ریز به طول ساق پای عقبی که بطور معکوس با اندازه بدن ارتباط دارد، برای تشخیص معتبر نیستند، همچنین تعداد موهای شاخک، نسبت موهای حاشیه بال جلوئی به عرض بال و تعداد موهای حسی Basiconic در شاخک‌ها به اندازه بدن بستگی دارند و با توجه به نوع میزبان و محیط تغییر می‌کنند. خصوصیات بیوشیمیائی بسیار کمتر از خصوصیات مرفولوژیک دچار تغییر می‌شوند و در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. عمدتاً آنزیم‌های استراز، مالات دهیدروژناز و سوپراکسایددیسموتاز در مطالعه آنزیمی تریکوگراما بکار رفته‌اند اما فقط آنزیم استراز ارزش تفکیک گونه‌ها را دارد و آنزیم‌های دیگر بیشتر برای مطالعه جمعیت‌ها استفاده می‌شوند. همچنین آنزیم‌های کاتالاز، فسفوگلوکوموتاز، اسید فسفاتاز و آلفا گلیسروفسفات‌دهیدروژناز نیز بکار برده شده‌اند.

در مطالعهٔ حاضر، از مشخصات دستگاه زادآوری و شاخک‌های نر و آنزیم استراز برای شناسائی گونه‌ها و مطالعه جمعیت‌ها استفاده شده‌است.

روش بررسی

زنبورهای تریکوگراما عمدتاً از طریق جمع‌آوری تخم‌های میزبان از روی محصولات مختلف در طبیعت بدست آمدند. تخم‌های جمع‌آوری شده داخل تیوب‌هائی با درپوش پنبه‌ای قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. پس از خروج زنبورها از تخم میزبان، تخم پروانهٔ *Ephestia* و در صورت نبودن آن تخم پروانه *Sitotroga* در اختیار آنها قرار می‌گرفت و با درجه حرارت ۲۴°C(±۰/۵) و رطوبت نسبی حدود ۷۰ درصد با ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی در انکوباتور پرورش داده می‌شدند. علاوه‌براین از نمونه‌های ارسال شده توسط همکاران از نقاط مختلف کشور استفاده گردید.

ابتدا اسلاید میکروسکوپی از دستگاه زادآوری و شاخک نر و حشره کامل تهیه می‌گردید. جهت تهیه اسلاید، نمونه‌های زنده مستقیماً داخل الکل ۷۵ درصد ریخته شده و پس از آن به یک قطره مایع Faure یا Hoyer در روی لام منتقل شده و جداسازی دستگاه زادآوری و شاخک روی لام در زیر بینوکولر انجام گرفته و لامل روی آن قرار می‌گرفت. نمونه‌های خشک به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در اسید استیک غلیظ قرار گرفته و پس از آن دستگاه زادآوری و شاخک‌ها جدا می‌شدند. از هر جمعیت

۱۰ اسلاید میکروسکوپی از حشره کامل نر و ماده و ۱۰ اسلاید میکروسکوپی از دستگاه زادآوری نر، شاخک نر و بال تهیه گردید. نمونه‌ها به کمک منابع و مقایسه با نمونه‌های تشخیص داده‌شده تا حد گونه یا گروه گونه تشخیص داده شدند. تشخیص‌ها بعداً با نتایج الکتروفورز تأیید و تکمیل گردید.

برای مطالعه آنزیمی از آنزیم استراز استفاده گردید. از دو روش به این منظور استفاده می‌شود، روش اوّل جدا کردن تخم‌ها بصورت انفرادی و استفاده از ۲۰ فرد حاصل از یک مادهٔ جفتگیری نکرده به منظور مطالعه فراوانی آلل‌ها و به دست‌آوردن فواصل ژنتیکی است که شرح کامل روش پس از تکمیل نتایج مطالعه فواصل ژنتیکی در مقاله‌ای جداگانه ارائه خواهد شد. روش دوم استفاده از ۲۰ فرد از میان جمعیت بطور تصادفی است که به منظور تشخیص گونه‌ها استفاده می‌شود و مطالعه جمعیت با این روش مقدور نیست. به این منظور از هر جمعیت پرورش داده‌شده تحت شرایط مذکور در بالا، ۲۰ فرد بطور تصادفی انتخاب شده و از این ۲۰ فرد یک هموژنیت تهیه می‌گردید. هموژنیزه‌کردن افراد داخل مایع Trudgill انجام می‌شد. برای ساختن مایع Trudgill مقدار ۰/۶۵۷ گرم تریس، ۰/۰۰۹ گرم اسید اسکوربیک و ۰/۰۰۷ گرم سیستئین مخلوط شده و حجم آن با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر می‌رسید. در هنگام استفاده ۸/۵ گرم ساکاروز به این محلول اضافه می‌شد. از این محلول مقداری با سرنگ درون لوله‌های میکروهماتوکریت که آنها را از وسط نصف کرده و یک طرف آن را روی شعله بسته‌شده بودند وارد می‌کنیم (بطوریکه طول محلول داخل لوله حدود یک سانتیمتر باشد) سپس درپوش پنبه‌ای لولهٔ حاوی زنبورها را روی یک سطح پلاستیکی سفید باز کرده و ۲۰ نمونه یا حشره زنده را به داخل لولهٔ میکروهماتوکریت هدایت نموده و با میلهٔ نازک نمونه‌ها را داخل مایع Trudgill هموژنیزه می‌کنیم،طوریکه رنگ محلول تیره شود (به جای لوله‌های میکروهماتوکریت می‌توان از لوله‌های اپندرف نیز استفاده کرد). تمام این عملیات باید روی حمام یخ انجام گیرد. این لوله‌های هموژنیزه‌شده را به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و تا هنگام استفاده در دمای $-20^{\circ}C$ قرار می‌دهیم.

الکتروفورز روی ژل‌پلی‌آکریل‌آمید و به روش عمودی انجام گرفت و اندازه قاب‌ها ۱۶۰×۲۰۰ میلیمتر و ضخامت ژل یک میلیمتر بود. نمونه‌هاپس از خارج کردن از دمای $-20^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و مقدار ۲۵ میکرولیتر از مایع روئی (Supernatant) در هر چاهک ژل قرار می‌گرفت. برای هر جمعیت ۲۰ نمونه آزمایش شد (جمعاً ۴۰۰ نمونه از هر جمعیت). الکتروفورز با ۱۵۰ ولت شروع شده و پس از نیم ساعت ولتاژ به ۴۵۰ رسانده می‌شد و به مدت ۷۵ دقیقه ادامه می‌یافت.

پس از پایان الکتروفورز ژل‌ها در محلول رنگ‌آمیزی ویژه استراز قرار داده می‌شد. برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی از دو محلول زیر استفاده می‌کنیم: A - ۲۷/۸ گرم فسفات مونوسدیک در یک