جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۳۲۵-۳۱۵)

انتقال افقی باکتری *Wolbachia* در زنبورهای تریکوگراما (Hym., Trichogrammatidae)

شهرام فرخی[۱]*، احمد عاشوری[۲]، مارتینوس اریس هویخنس[۳] و پاتریک وربارشات[۴]
۱، استادیار مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، ۲، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، استادیار آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخینگن هلند، ۴، کارشناس آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه واخینگن هلند

(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

چکیده

باکتری *Wolbachia* به عنوان همزیست درون سلولی و عامل القاکننده بکرماده‌زایی در زنبورهای تریکوگراما محسوب می‌گردد، به نحوی که افراد ماده بدون جفتگیری تولید نتاج ماده خواهند نمود. با توجه به اینکه انتقال باکتری *Wolbachia* عمدتاً از مادر به فرزندان و از طریق سیتوپلاسم تخم می‌باشد، این تغییر در سیستم تولیدمثلی میزبان موجب افزایش انتقال باکتری به نسل‌های بعدی می‌شود. در این بررسی انتقال درون و بین‌گونه‌ای باکتری القاکننده ماده‌زایی در بین زنبورهای تریکوگراما مورد بررسی قرار گرفت، که لاین ایرانی $B\ 11W^{+}$ زنبور *Trichogramma brassicae* به عنوان زنبور آلوده به استرین $wBa_{T.bra}$ باکتری و لاین‌های هلندی Y 175 زنبور *T. brassicae* و GD 011 زنبور *Trichogramma evanescens* به عنوان زنبورهای غیرآلوده و گیرنده در نظر گرفته شدند. انتقال افقی در هر دو حالت با تغذیه هم‌زمان لاروهای آلوده و غیرآلوده زنبور به طور مشترک از یک عدد تخم *Mamestra brassicae* صورت گرفت و در نهایت با ردیابی باکتری در زنبورهای گیرنده به روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *wsp*، ناحیه ITS-2 و ریزماهوارک TTG 49 موفقیت‌آمیز بودن انتقال باکتری به اثبات رسید. همچنین با بررسی نتاج افراد گیرنده در مجموع میزان انتقال درون‌گونه‌ای با ۷۸/۸٪ موفقیت در انتقال باکتری به نسل F1 و استمرار در القای بکرزایی در ۳۸/۵٪ از نسل بعدی، بیشتر از حالت بین‌گونه‌ای برآورد گردید. با توجه به مزیت‌های نسبی پارازیتوئیدهای تک‌جنسی برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک، نتایج این تحقیق می‌تواند از جنبه کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ***Wolbachia***، **انتقال درون‌گونه‌ای، انتقال بین‌گونه‌ای، تریکوگراما، ماده‌زایی.**

مقدمه

باکتری‌های *Wolbachia* به صورت همزیست با تعدادی از حشرات و کنه‌ها ارتباط دارند که در مورد گروه‌های مختلف حشرات ۱۷ تا ۷۶ درصد از گونه‌ها را شامل می‌شود (Werren, 1997; Jeyaprakash & Hoy, 2000). این همزیست‌های داخلی جزو رده آلفا-پروتئوباکتریا[۱] بوده، بافت‌های مختلفی از بدن بندپایان را آلوده می‌کنند. باکتری‌های مزبور به دلیل آنکه با ایجاد

1. α-proteobacteria

* نویسنده مسئول: شهرام فرخی تلفن: ۶-۲۲۴۰۳۰۱۲-۰۲۱ E-mail: shahram.farrokhi@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تغییراتی در سیستم تولیدمثل میزبان باعث افزایش انتقال عمودی و وراثت‌پذیری خود می‌شوند، مورد توجه محققین واقع شده‌اند. این تغییرات شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی[1] در برخی از خرخاکی‌ها، حشرات و کنه‌ها (Breeuwer & Jacobs, 1996)، مؤنث‌سازی[2] در خرخاکی‌ها با تغییر وضعیت ژنتیکی نرها و تبدیل آنها به ماده‌های کارآمد (Juchault *et al*., 1992)، کشتن نرها[3] در تعدادی از سخت‌بال‌پوشان، بال‌پولک‌داران و دوبالان از طریق نابود کردن جنین نر (Jiggins *et al*., 1988; Hurst *et al*., 2000; Majerus *et al*., 2000) و القای بکرزایی (Parthenogenesis inducing-PI) در حشرات پارازیتوئید (Stouthamer *et al*., 1993; Stouthamer *et al*., 1990) می‌باشد. این باکتری بر اساس توالی ژن *ftsZ* و 16S rRNA به شش گروه (بالا گروه) A-F تقسیم می‌شود که گروه‌های A، B، E و F شامل استرین‌های وابسته به بندپایان می‌باشند (Vandekerckhove *et al*., 1999; Lo *et al*., 2002). در زنبورهای تریکوگراما تنها استرینی که در گونه *Trichogramma bourarachae* Pintureau & Babault باعث افزایش باروری و زادآوری می‌شود متعلق به گروه A بوده (Vavre *et al*., 1999) و سایر استرین‌ها که موجب القای ماده‌زایی (thelytoky) در زنبورهای باکره می‌شوند عمدتاً در گروه B و همچنین گروه A قرار گرفته‌اند (Pintureau *et al*., 2002; Zhong & Shen, 2004). باکتری *Wolbachia* در اندام‌های تولیدمثل جنسی (تخمدان و بیضه) تعدادی از بندپایان تکثیر می‌شود و انتقال آنها از حشره مادری به نتاج از طریق سیتوپلاسم تخم صورت می‌گیرد. به دلیل آنکه اسپرم تقریباً فاقد سیتوپلاسم می‌باشد - گرچه نرها نیز می‌توانند به این باکتری آلوده شوند - حشرات نر به ویژه در مورد زنبور تریکوگراما نقش مؤثری در انتقال این میکروارگانیزم ایفا نمی‌کنند. لذا این باکتری جنس ماده را به عنوان میزبان ترجیح داده و با مکانیزم‌های مختلف در جهت تغییر نسبت جنسی حشرات تأثیر می‌گذارد (Enserink, 1997; Boleat *et al*., 2000).

1. Cytoplasmic incompatibility-CI
2. Feminization
3. Male-killing

به نظر می‌رسد این موضوع که توارث و انتقال عمودی همزیست‌ها در میزبان‌هایی رخ می‌دهد که طی سالیان متمادی با آنها به یک همبستگی تنگاتنگ رسیده‌اند، در مورد باکتری *Wolbachia* به صورت قطعی مصداق نداشته باشد. از شواهد و بررسی‌های شجره‌شناسی و تکاملی نیز چنین بر می‌آید که این باکتری‌ها می‌بایست به صورت افقی در بین گونه‌ها و افراد مختلف جمعیت منتقل شوند، چرا که استرین‌هایی از باکتری که دارای قرابت ژنتیکی می‌باشند در میزبان‌هایی یافت شده‌اند که از لحاظ رده‌بندی و تکاملی غیر خویشاوند هستند (O'Neill *et al*., 1992; Rousset *et al*., 1992; Stouthamer *et al*., 1993; Werren *et al*., 1995). نتایج حاصل از تحقیقاتی که تزریق باکتری *Wolbachia* با میکروپیپت و سوزن‌های مخصوص و بسیار ظریف به مرحله جنینی میزبان‌های عاری از باکتری انجام شده است نیز حاکی از موفقیت در انتقال افقی درون‌گونه‌ای باکتری در گونه‌های مگس *Drosophila* و انتقال بین‌گونه‌ای در نوعی پشه و مگس سرکه می‌باشد (Boyle *et al*., 1993; Braig *et al*., 1994; Rousset & Stordeur, 1994). همچنین در بررسی‌های انجام شده روی چندین گونه از خرخاکی‌ها، انتقال افقی باکتری *Wolbachia* به روش تزریق عصاره تخمک یا تخمدان جانور با ابزارهای بسیار ظریف گزارش شده است (Rigaud & Juchault, 1995). البته مواردی هم از عدم موفقیت در تزریق باکتری به پارازیتوئیدهایی مانند *Muscidifurax uniraptor* Kogan & Legner و *Nasonia vitripennis* (Walker) وجود دارد (van Meer *et al*., 1996). برای اولین بار Grenier *et al*. (1998) توانستند به روش تزریق بسیار ظریف (microinjection) در زنبورهای پارازیتوئید استرینی از PI-*Wolbachia* را از گونه *Trichogramma pretiosum* Riley به شفیره غیرآلوده *Trichogramma dendrolimi* Matsumura با موفقیت منتقل نموده و تداوم آلودگی و ماده‌زایی را در ۲۶ نسل متوالی از زنبور گیرنده اثبات نمایند. همچنین Fujii *et al*. (2001) نشان دادند که انتقال یک استرین خالص از *Wolbachia* می‌تواند فنوتیپ‌های متفاوتی را در میزبان‌های مختلف به وجود آورد، هر چند به طور کلی تداوم نرخ بالایی از آلودگی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در نسل‌های متعدد و متوالی از لاین‌های تازه آلوده شده به راحتی میسر نمی‌باشد (van Meer & Stouthamer, 1999; Pintureau *et al*., 2000b; McGraw *et al*., 2002). در تحقیقی که Pintureau *et al*. (2000b) با استفاده از تکنیک FISH[1] غلظت یا کمیت باکتری را در مراحل نابالغ زنبور تریکوگراما مورد بررسی و ردیابی قرار دادند، علیرغم بالا بودن غلظت *Wolbachia* در عصاره‌ای که برای تزریق مورد استفاده قرار گرفته بود، آنها میزان فراوانی باکتری را در لاین‌های تلقیح شده ناچیز و رو به کاهش گزارش نمودند. برای اولین بار Huigens *et al*. (2000) از بررسی‌های آزمایشگاهی خود انتقال افقی طبیعی را در بین جمعیت‌های زنبور *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer در حد قابل توجهی تجربه کردند. به این صورت که با فراهم نمودن شرایط مناسب برای پارازیته کردن تخم پروانه *Trichoplusia ni* (Hübner) توسط لاین‌های غیرآلوده و آلوده به PI-*Wolbachia* به فاصله دو ساعت از یکدیگر و تغذیه اشتراکی لاروهای زنبور از ماده غذایی داخل تخم، نهایتاً لاروهای سالم آلودگی باکتریایی را با تغذیه از لاروهای آلوده کسب نمودند. در بررسی جامع‌تری که با استفاده از چهار گونه زنبور تریکوگراما به عنوان لاین‌های غیرآلوده و آلوده به باکتری و دو گونه پروانه میزبان (*Mamestra brassicae*, *T. ni*) صورت گرفت، بسته به شرایط و نحوه انتقال درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای، ۳۹-۰ درصد از زنبورهای ماده آلودگی باکتریایی را بر اثر سوپرپارازیتیسم[2] و مولتی‌پارازیتیسم[3] دریافت نمودند (Huigens *et al*., 2004). در نسل بعد درصدی از زنبورهای ماده که به تازگی آلوده شده بودند به صورت بکرزایی، نتاج ماده تولید کردند. کاهش میزان آلودگی در نسل‌های بعدی تداوم یافته به نحوی که در مورد یکی از لاین‌ها تمام نتاج ماده‌های باکره در نسل‌های F4 و F9 نر شدند. به طور کلی نتایج مبین آن بودند که انتقال افقی درون‌گونه‌ای در مقایسه با انتقال بین‌گونه‌ای از موفقیت بیشتری برخوردار است.

زنبورهای تریکوگراما از نظر تولیدمثلی به صورت هاپلو- دیپلوئیدی عمل می‌کنند، به نحوی که نتاج ماده از تخم‌های تلقیح شده (دیپلوئید) و نتاج نر از تخم‌های تلقیح نشده (هاپلوئید) ایجاد می‌شوند. از بین بیش از ۱۸۰ گونه زنبور تریکوگراما (Pinto, 1998)، حداقل در ۱۸ گونه از آنها نقش باکتری *Wolbachia* به عنوان عامل القاکننده ماده‌زایی در اثر بکرزایی شناخته شده است (Pinto & Stouthamer, 1994; Schilthuizen & Stouthamer, 1997; Stouthamer, 1997; Pintureau *et al*., 2000a; Ciociola *et al*., 2001; Almeida, 2004; Zhong & Shen, 2004). در زنبورهای آلوده به PI-*Wolbachia* از تخم‌های تلقیح شده و تلقیح نشده نتاج ماده به وجود می‌آید. در تخم‌های بارور نشده تغییری در مرحله آنافاز[4] اولین تقسیم میتوزی رخ می‌دهد و موجب دوتایی شدن مجموعه n کروموزومی مادری می‌گردد که به دو برابر شدن گامت[5] موسوم است (Stouthamer & Kazmer, 1994). تغییر به وجود آمده در سیستم تولید مثلی با اعمال یک تیمار آنتی‌بیوتیکی قابل مداوا و برگشت به شیوه متداول در این پارازیتوئیدهای تخم خواهد بود (Stouthamer *et al*., 1990).

تجزیه و تحلیل رابطه تکاملی *Wolbachia*-*Trichogramma* بیانگر نوعی عدم هماهنگی آشکار بین فیلوژنی تریکوگراما و باکتری همزیست آن می‌باشد که به احتمال زیاد علت آن را می‌توان در انتقال افقی باکتری جستجو نمود (Schilthuizen & Stouthamer, 1997). انتقال افقی معمولاً در مواقعی رخ می‌دهد که گونه‌ها و اکوتیپ‌های مختلف تریکوگراما همزمان یک تخم میزبان را برای تخمریزی انتخاب کنند (Huigens *et al*., 2000). انتقال‌های افقی در مواردی که زنبورها با استرین‌های مختلفی از باکتری آلوده باشند، می‌تواند به آلودگی‌های دوتایی یا سه‌تایی منجر شود. گرچه آلودگی‌های چندگانه تاکنون در زنبور تریکوگراما گزارش نشده، اما در سایر حشرات میزبان به ویژه آنهایی که با استرین‌های CI-*Wolbachia* در ارتباط هستند مشاهده شده است (van Meer *et al*., 1996). آلودگی‌های

1. Fluorescence *in situ* hybridization
2. Superparasitism
3. Multiparasitism
4. Anaphase
5. Gamete duplication

چندگانه امکان ایجاد استرین‌های نوترکیب را فراهم می‌نماید. در چندین استرین از *Wolbachia* چنین تبادلات ژنتیکی در ژن *wsp*، (*Wolbachia* specific protein gene) تأیید شده است (Jiggins *et al.*, 2001; Werren & Bartos, 2001). در این تحقیق انتقال افقی و طبیعی باکتری در زنبور تریکوگراما به دو صورت مورد بررسی قرار گرفته است؛ حالت اول انتقال درون‌گونه‌ای ازطریق سوپرپارازیتیسم تخم میزبان توسط زنبورهای مادری آلوده و غیرآلوده از یک گونه، و حالت دوم انتقال بین‌گونه‌ای ازطریق مولتی‌پارازیتیسم تخم میزبان بوسیله زنبورهای مادری آلوده وغیرآلوده از گونه‌های مختلف می‌باشد. نتایج این بررسی می‌تواند از لحاظ روابط تکاملی میزبان- باکتری و همچنین از جنبه کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

پرورش زنبورهای تریکوگراما

به منظور انجام آزمایشات انتقال افقی درون و بین‌گونه‌ای، با استفاده از زنبورهای تک‌ماده[1] سه لاین مجزا به اسامی $B\ 11W^+$ و Y 175 مربوط به گونه *Trichogramma brassicae* Bezd. و GD 011 متعلق به گونه *Trichogramma evanescens* West. تهیه و تا زمان آزمایشات چندین نسل در شرایط ۲۴±۱°C، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و طول دوره روشنایی ۱۶ و تاریکی ۸ ساعت روی تخم‌های عقیم شده پروانه آرد (*Anagasta kuehniella* (Zeller)) پرورش داده شدند. منشأ اولیه لاین ایرانی $B\ 11W^+$ که به عنوان زنبور آلوده و دهنده باکتری *Wolbachia* مورد استفاده قرار گرفت، مربوط به دسته تخم‌های پارازیته ساقه‌خوار اروپایی ذرت (*Ostrinisa nubilalis* (Hübner)) بود که در سال ۱۳۸۴ از بابلسر و از روی گیاه توق یا مستک (*Xanthium strumarium* L.) جمع‌آوری شدند. در این جمعیت مخلوطی از افراد آلوده و غیرآلوده به صورت آمیخته با هم (mixed) وجود داشت. منشأ لاین‌های Y 175 و GD 011 نیز که به عنوان زنبورهای غیرآلوده و گیرنده باکتری در نظر گرفته شدند، مربوط به تخم‌های پارازیته سفیده‌های کلم (*Pieris* spp.) می‌باشد که درسال ۱۳۸۶ از هلند و از روی چلیپائیان مختلف (بوته‌های کلم) جمع‌آوری شدند.

آزمایشات انتقال افقی درون و بین‌گونه‌ای و نحوه ردیابی باکتری در زنبورهای گیرنده

برای انتقال درون‌گونه‌ای استرین $wBa_{T.bra}$ باکتری *Wolbachia* به تخم‌های پارازیته‌ای نیاز بود که تقریباً به طور هم‌زمان حاوی تخم و لارو زنبور آلوده (دهنده باکتری) و غیرآلوده (گیرنده) هم‌گونه خود باشند. انتقال درون‌گونه‌ای بین اکوتیپ آلوده ایرانی و غیرآلوده هلندی *T. brassicae* انجام شد. برای انتقال بین‌گونه‌ای نیز تخم‌های پارازیت شده‌ای تدارک دیده شد که مراحل نابالغ زنبور آلوده ایرانی *T. brassicae* و زنبور غیرآلوده هلندی *T. evanescens* را شامل می‌شدند. در واقع با فراهم نمودن شرایط سوپرپارازیتیسم و یا مولتی‌پارازیتیسم، لاروهای آلوده و غیرآلوده از یک منبع غذایی مشترک تغذیه می‌شدند و در صورتیکه در این رقابت لاروهای غیرآلوده با تغذیه از لاروهای آلوده به باکتری بر آنها فائق می‌آمدند، شرط لازم برای انتقال باکتری فراهم می‌گردید.

با توجه به تأثیر اندازه و کیفیت تخم میزبان در امکان پرورش هم‌زمان دو یا چند زنبور پارازیت و همچنین نتایج مثبتی که Huigens *et al.* (2000, 2004) در این زمینه به دست آوردند، از تخم‌های پروانه کلم *Mamestra brassicae* (L.) (Lep., Noctuidae) که آلوده نبودن آنها به باکتری تأیید شده بود، به عنوان میزبان مشترک لاین‌های مختلف تریکوگراما استفاده شد. معمولاً زنبور تریکوگراما در تخم‌های نسبتاً بزرگ میزبان ۲ الی ۴ عدد تخم قرار می‌دهد. ابتدا تخم‌های پروانه کلم در اختیار یک زنبور ماده از لاین غیرآلوده قرار داده شد و پس از دو ساعت با حذف آن، زنبور ماده دیگری از لاین آلوده به میزبان پارازیته معرفی گردید. ظاهراً تقدم و تأخر در معرفی زنبور آلوده یا غیرآلوده تأثیری در میزان موفقیت انتقال باکتری ندارد (مذاکرات شفاهی با Huigens). دو تا سه ساعت پس از پارازیت شدن مجدد، تخم‌های پارازیته (به ترتیب ۹۷ و ۹۴ عدد تخم برای انتقال درون و بین‌گونه‌ای) تا زمان خروج حشرات کامل F1 به طور جداگانه در انکوباتور (۲۴±۱°C،

1. Isofemale

۱۰±۶۰ RH% و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶:۸) نگهداری شدند. به منظور بررسی وضعیت انتقال عمودی و القای بکرزایی (PI)، پس از خروج زنبورهای ماده‌ای که احتمال انتقال آلودگی در آنها وجود داشت، تخم عقیم شده *A. kuehniella* به مدت دو روز در اختیارشان گذاشته شد و مجدداً تخم‌های پارازیته تا زمان خروج حشرات کامل F2 در انکوباتور باقی ماندند.

برای ردیابی *Wolbachia* در حشرات کامل F1 و F2 و تعیین میزان موفقیت در انتقال باکتری از روش مولکولی و آغازگر (primer) اختصاصی ژن *wsp* (*81F* و *691R*) استفاده شد. به دلیل عدم تفاوت ظاهری زنبورها (از نظر رنگ یا اندازه) در لاین‌های آلوده و غیرآلوده *T. brassicae* و *T. evanescens* و همچنین یافتن وجه تمایز لاین‌های ایرانی و هلندی *T. brassicae*، برای تعیین گونه یا اکوتیپ مادری زنبورهای F1 از نشانگرهای مولکولی استفاده شد. در مورد آزمایش‌های انتقال بین‌گونه‌ای با استفاده از آغازگر اختصاصی ناحیه ITS-2 (Internal Transcribed Spacer-2)، تفاوت در اندازه محصول PCR گونه‌های *T. brassicae* و *T. evanescens* به اندازه‌ای است که حتی بدون نیاز به آنزیم‌های برش‌دهنده[1] نیز تفکیک دقیق آنها امکان‌پذیر می‌باشد. در خصوص آزمایش‌های انتقال درون‌گونه‌ای ریزماهوارک‌های (microsatellites) CT 122 و TTG 49 به عنوان نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند که برای این مورد خاص ریزماهوارک TTG 49 تمایز بهتری را بین اکوتیپ‌های ایرانی و هلندی *T. brassicae* ایجاد نمود. حضور افراد ماده در بین نتاج زنبورهای باکره F1 که به لاین گیرنده تعلق داشتند بیانگر انتقال افقی *Wolbachia* و القای بکرزایی در آنها بود که البته برای تأیید مجدد نیز با روش مولکولی، صحت آن مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایشات مولکولی جهت تشخیص آلودگی در اکوتیپ‌های مختلف زنبور

برای استخراج DNA در نمونه‌های مورد نظر مطابق روش Huigens *et al.* (2004) ابتدا برای هموژنیزه شدن آنها، زنبورها را به صورت انفرادی در لوله‌های پلاستیکی دردار ۰/۵ میلی‌لیتری (لوله‌های اپندورف استریل) قرار داده، با استفاده از پیپت پاستوری که انتهای آن بسته شده بود روی نمونه فشار مختصری وارد آمد. سپس ۵۰ میکرولیتر از Chelex-100 پنج درصد و ۴ میکرولیتر Proteinase K (۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. نمونه‌ها حداقل به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۶°C و متعاقب آن ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر اپندورف[2] در لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر، ۵ میکرولیتر بافر سبز[3] 5X (Promega, Madison, WI, USA)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (هر کدام با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رو به جلو و معکوس 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. توالی آغازگرها و مبنای اصلی برنامه مورد استفاده برای هر یک از آنها به این شرح بود:

۱)

ITS2-*f* 5’-TGTGAACTGCAGGACACATG-3’
ITS2-*r* 5’-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3’

سه دقیقه در ۹۴°C، ۳۳ تکرار از ۴۰ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۵۳°C و ۴۵ ثانیه در ۷۲°C و در نهایت بعد از آخرین سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲°C (Silva, 1999).

۲)

TTG49-*f* 5’-GTAGTCTGGTTTTCGATTCCCA-3’
TTG49-*r* 5’-TCCCCGACCTATCGATTTTCC-3’

پنج دقیقه در ۹۴°C، ۴۵ تکرار از یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۶۳°C و یک دقیقه در ۷۲°C و در نهایت بعد از آخرین سیکل، ۵ دقیقه در ۷۲°C (Huigens, 2003 و روش منتشر نشده Stouthamer).

۳)

wsp-f 5’-GGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3’
wsp-r 5’-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3’

1. Restriction enzymes

2. Eppendorf thermocycler
3. Green PCR reaction buffer

سه دقیقه در ۹۴°C، ۴۰ تکرار از یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۵۰°C و یک دقیقه در ۷۲°C و در نهایت بعد از آخرین سیکل، ۵ دقیقه در ۷۲°C (Braig *et al.*, 1998). الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های اصلی و شاهد در کنار نشانگر نردبانی ۱۰۰ جفت‌باز[1] به مدت ۷۵ دقیقه روی ژل استاندارد ۱/۵ درصد آگارز انجام شد. البته در مواردی که از ریزماهوارک‌ها استفاده می‌گردید به دلیل اختلاف بسیار جزئی بین سوش‌های مختلف یک گونه، از ژل ۲-۱/۵ درصد و مدت زمانی در حدود ۹۰ دقیقه برای تفکیک هر چه بیشتر نمونه‌ها استفاده شد. در نهایت پس از تهیه عکس از ژل‌ها و مقایسه باندهای ایجاد شده با نمونه‌های استاندارد نتایج از لحاظ انتقال آلودگی در زنبورهای لاین گیرنده و نیز تعیین گونه یا اکوتیپ زنبور ارزیابی و تفسیر شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی از آزمون مربع کای (χ^2-test) برای مقایسه آماری و بررسی فراوانی انتقال افقی و القای بکرزایی به زنبورهای F2 استفاده گردید که یکسان بودن احتمال انتقال باکتری در هر دو روش درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای به عنوان فرض صفر در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاکی از انتقال افقی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای باکتری از لاین ایرانی B 11W$^+$ به لاین‌های غیرآلوده هلندی *T. brassicae* و *T. evanescens* می‌باشد که اولین گزارش انتقال افقی *Wolbachia* در این گونه‌ها محسوب می‌شود. درصد انتقال در حالت درون‌گونه‌ای (بر اثر سوپرپارازیتیسم) و بین‌گونه‌ای (بر اثر مولتی‌پارازیتیسم) متفاوت بوده که به ترتیب ۷۸/۸٪ و ۵۸/۳٪ برآورد گردید. البته مقادیر برآورد شده کمتر از درصد واقعی انتقال باکتری در این آزمایشات است، چرا که احتمالاً تراکم یا غلظت باکتری در برخی از زنبورهای نسل اول کمتر از حد قابل ردیابی به روش PCR می‌باشد. از لحاظ آماری میزان انتقال درون‌گونه‌ای از لاین B 11W$^+$ به Y 175 (*T. brassicae*) به طور معنی‌داری (در سطح ۱٪) بیش از فرض صفر بوده و آن را رد می‌کند (χ^2 =۱۰/۹۳، p <۰/۰۰۱، n = ۳۳). در حالی که میزان موفقیت در انتقال بین‌گونه‌ای از لاین B 11W$^+$ (*T. brassicae*) به GD 011 (*T. evanescens*) اختلاف معنی‌داری وجود نداشته و فرض صفر تأیید می‌شود (χ^2 =۰/۶۶، p = ۰/۴۱۷، n = ۲۴) (جدول ۱). به عبارتی درصد موفقیت انتقال افقی درون‌گونه‌ای (بین دو اکوتیپ از یک گونه) از انتقال بین‌گونه‌ای بیشتر است. بررسی وضعیت ماده‌زایی بر اثر PI-*Wolbachia* در نسل دوم (F2) نشان داد که میزان موفقیت در انتقال عمودی باکتری به نسل بعدی در گونه‌های *T. brassicae* و *T. evanescens* به ترتیب ۳۸/۵٪ و ۲۱/۴٪ است که نشان‌دهنده روند نزولی در میزان انتقال باکتری به نسل دوم می‌باشد. گرچه میزان موفقیت در هر دو حالت کمتر از درصد موفقیت پیش‌بینی شده در فرض صفر است، اما از نظر آماری در سطح ۵٪ تفاوت میزان انتقال در حالت بین‌گونه‌ای (که گیرنده باکتری زنبور *T. evanescens* می‌باشد) با فرض صفر معنی‌دار بوده و آن را رد می‌کند (χ^2 =۴/۵۷، p=۰/۰۳۳، n=۱۴). حال آنکه میزان موفقیت در انتقال عمودی که دهنده و گیرنده اولیه باکتری هر دو متعلق به یک گونه بودند (*T. brassicae*) بیشتر می‌باشد (χ^2=۱/۳۸، p=۰/۲۴، n=۲۶) (جدول ۱).

1. base pair - bp

جدول۱- انتقال افقی بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای باکتری *Wolbachia* در زنبور تریکوگراما

زنبورآلوده به باکتری	زنبور گیرنده	تعداد تخم میزبان	تعداد زنبور ماده بررسی شده	انتقال افقی در F1	χ^2	P-value	القا بکرزایی در زنبورهای ماده تازه آلوده شده (F2)	χ^2	P-value
T. brassicae (B11W$^+$)	*T. brassicae* (Y 175)	۹۷	۳۳	٪۷۸/۸	۱۰/۹۳**	<۰/۰۰۱	٪۳۸/۵	۱/۳۸^{ns}	۰/۲۴۰
T. brassicae (B11W$^+$)	*T. evanescens* (GD 011)	۹۴	۲۴	٪۵۸/۳	۰/۶۶^{ns}	۰/۴۱۷	٪۲۱/۴	۴/۵۷*	۰/۰۳۳

*، **: اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطوح ۵ و ۱ درصد

ns: فاقد اختلاف معنی‌دار

به طور کلی در موارد انتقال افقی در هر دو شکل بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای، هرگز تمام نتاج ماده‌های باکره آلوده به *Wolbachia* را زنبورهای ماده تشکیل نمی‌دادند. در مجموع در بین زنبورهای نسل دوم از ۱۹ زنبور دریافت کننده باکتری، بکرزایی در ۱۳ زنبور به صورت نر و ماده‌زایی[1] و در شش زنبور دیگر به شکل نرزایی[2] بود که این نتیجه امکان آلودگی زنبورهای نر را تأیید می‌کند (جدول ۲). همچنین در حین بررسی‌ها دو نمونه زنبور آلوده *T. brassicae* به شکل نر- ماده[3] مشاهده شد که دارای ژنیتالیای ماده و یک جفت شاخک نر بودند. با در اختیار گذاشتن تخم بید آرد مشخص شد که تنها یکی از آنها که حرکات شاخکی مشابه ماده‌های معمولی داشت، قادر به پارازیته کردن تخم میزبان و تولید نتاج عادی بود.

بحث

انتقال افقی PI-*Wolbachia* در میان نتاج ماده‌های آلوده می‌تواند زمینه‌ساز نوترکیبی و تلاقی جوره‌های (variants) مختلفی از این باکتری بشود که به این صورت از اثرات منفی موتاسیون‌های مضر آنها کاسته شود. در صورت امکان‌پذیر نبودن انتقال افقی، باکتری‌های همزیست موجودات تک‌جنسی[4] که صرفاً از طریق انتقال عمودی (مادر به فرزند) به ارث می‌رسند، از انباشته شدن موتاسیون‌ها مانند اثر چرخ دنده ضامن‌دار مولر[5] صدمه خواهند دید. نتایجی که تاکنون در زمینه انتقال افقی باکتری *Wolbachia* در زنبورهای تریکوگراما (*T. kaykai & T. deion*) به دست آمده حاکی از موفقیت انتقال طبیعی بر اثر تغذیه لارو زنبورهای آلوده و غیرآلوده به صورت مشترک از یک تخم می‌باشد (Huigens, 2003; Huigens *et al*., 2004). در بررسی‌های صحرایی موارد متعددی از سوپرپارازیتیسم و مولتی‌پارازیتیسم تخم آفات (به ویژه بال‌پولک‌داران) توسط زنبورهای تریکوگراما که دامنه میزبانی وسیعی دارند، گزارش شده است که نشان می‌دهد شرایط لازم برای انتقال افقی این باکتری همزیست به شکل‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در شرایط مزرعه وجود دارد (Pinto. 1998). برای مثال Ebrahimi (1999) در بررسی‌های انجام شده طی سال‌های ۷۷-۱۳۷۳ گونه‌های *T. brassicae* و *T. evanescens* را به طور همزمان در چندین منطقه از جمله ساوه، تنکابن، چالوس، آمل، ساری و مشهد جمع‌آوری نمود که در مجموع نشان‌دهنده فراهم بودن شرایط لازم برای انتقال افقی باکتری است. انتقال افقی بین‌گونه‌ای *Wolbachia* دلیلی بر عدم هماهنگی فیلوژنی این باکتری و زنبور *Trichogramma* می‌باشد (Schilthuizen & Stouthamer, 1997).

محدودیت در بروز ماده‌زایی بر اثر انتقال افقی احتمالاً به دلیل پائین بودن تراکم باکتری در لاین‌های گیرنده (یا حتی دهنده) است که می‌تواند مربوط به اثر میزبان باشد. تراکم باکتری نقش مهمی در انتقال افقی *Wolbachia* در زنبور تریکوگراما دارد (Grenier *et al*., 1998). در واقع یک آستانه تأثیر برای این باکتری وجود دارد که در مورد *Wolbachia* عامل ناسازگاری سیتوپلاسمی (CI) در تحقیقاتی که روی مگس‌های *Drosophila* spp. و زنبور *Nasonia vitripennis* انجام شد، یک حداقل تراکم (غلظت) مورد نیاز از باکتری که بتواند منجر به اختلالات فیزیولوژیکی میزبان شود مشخص شده است (Breeuwer & Werren, 1993; Karr, 1994; Bourtzis *et al*., 1996).

1. deuterotoky
2. arrhenotoky
3. gynandromorph
4. asexual
5. muller's ratchet

جدول۲- نسبت جنسی نتاج زنبورهای دریافت‌کننده باکتری *Wolbachia*

زنبور گیرنده باکتری (F2)	تعداد نمونه بررسی شده	نوع بکرزایی	نسبت جنسی مجموع نتاج به دست آمده		
			نر	ماده	میانگین درصد ماده‌ها
T. brassicae (Y 175)	۱۰	نر و ماده‌زایی	۱۹	۸۴	۸۱/۶
	۴	نرزایی	۲۹	۰	۰
T. evanescens (GD 011)	۳	نر و ماده‌زایی	۱۶	۲۲	۵۷/۹
	۲	نرزایی	۱۱	۰	۰

فرضیه دیگری که در مورد عدم موفقیت یا پائین بودن میزان انتقال افقی مطرح می‌باشد این است که در تأثیرات متقابل میان باکتری همزیست زنبور دهنده و ژنوم زنبور گیرنده ناسازگاری در جهت بروز ماده‌زایی وجود دارد (Heath *et al*., 1999; van Meer & Stouthamer, 1999). به عبارت دیگر، ایجاد پدیده بکرماده‌زایی[1] می‌تواند تحت تأثیر چندین عامل از جمله؛ استرین و تراکم باکتری، ژنوتیپ میزبان یا اثر متقابل ما بین آنها باشد. همانطور که از نتایج این بررسی و تحقیقات مشابه (Huigens *et al*., 2004) نیز مشخص گردید که موفقیت انتقال افقی درون‌گونه‌ای بیشتر از بین‌گونه‌ای می‌باشد. برای انجام یک انتقال موفق، لازم است که ابتدا جمعیت باکتری بر اثر تکثیر در تخمدان زنبور گیرنده به حد کافی افزایش یابد تا پس از انتقال عمودی موجب القای بکرزایی گردد. لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که شرط لازم برای انتقال وجود غلظت مناسب از باکتری در زنبور دهنده است اما شرط کافی محسوب نمی‌گردد. در این تحقیق نیز مانند بررسی‌های مشابه (Huigens *et al*., 2000; Huigens *et al*., 2004)، هیچ‌گاه ماده‌های باکره تازه آلوده شده (F1) منحصراً تولید نتاج ماده نکردند و دست‌کم یک زنبور نر در بین افراد نسل بعدی (F2) مشاهده گردید. ضمن آنکه نسبت جنسی نتاج تنوع و تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد. این نتایج همگی دال بر تأثیر تراکم باکتری در کنار سایر عوامل بر میزان القای بکرزایی می‌باشد. مطالعه در زمینه امکان انتقال *Wolbachia* بین گونه‌هایی که از نظر فیلوژنی متفاوت بوده و از یکدیگر دور می‌باشند، می‌تواند زمینه‌ساز بررسی نحوه تأثیر باکتری مزبور در ارتباط با ژنوم میزبان محسوب شود. همچنین انتقال این باکتری می‌تواند به عنوان یک ناقل برای توزیع ژن‌های مفید در جمعیت‌های حشرات مورد استفاده قرار گیرد (Beard *et al*., 1993).

موفقیتی که در این بررسی در راستای تأیید و تکمیل تحقیقات به عمل آمده در خصوص انتقال افقی باکتری *Wolbachia* بین دو گونه زنبور تریکوگراما به دست آمد، می‌تواند رهنمودی در جهت تبدیل گونه‌های دوجنسی مورد استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک به زنبورهایی با کارایی بیشتر از طریق افزایش درصد افراد ماده در بین نتاج زنبورهای پرورش یافته در انسکتاریوم‌ها محسوب شود (Pintureau *et al*., 1993; Stouthamer, 1993)، که در ضمن کاهش هزینه‌های تولید را نیز در پی خواهد داشت (van Meer *et al*., 1996). گر چه ماده‌زایی در استرین‌هایی که آلودگی آنها به صورت اکتسابی می‌باشد به عنوان یک ویژگی برجسته و مفید ثابت شده است، اما برای مثال میزان باروری و تعداد نتاج ماده در لاین‌های بکرماده‌زای *Trichogramma deion* Pinto & Oatman و *T. pretiosum* در قیاس با هم‌گونه‌های دوجنسی آنها پائین‌تر می‌باشد (Stouthamer & Luck, 1993). از طرفی، در زنبور *Encarsia formosa* Gahan که با تیمار آنتی‌بیوتیکی همزیست‌های باکتریایی خود را از دست داده بود در قیاس با زنبورهای معمولی تعداد نتاج کمتری را تولید نمود، حال آنکه در زنبور *Muscidifurax uniraptor* Kogan & Legner تفاوتی در تعداد نتاج زنبورهای تیمار شده و عادی مشاهده نشده است (Stouthamer *et al*., 1994). لذا ضروری است پیش از هر گونه توصیه کاربردی نسبت به فراهم نمودن شرایط بهینه برای زنبورهای ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* و حذف اثرات نامطلوب عوامل همزیست اهتمام ورزید و گام‌های مؤثرتری را در جهت افزایش بهره‌وری و استفاده از این نوع عوامل بیولوژیک تک‌جنسی برداشت.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از رساله دکتری نویسنده اول با عنوان ارزیابی تأثیر باکتری *Wolbachia* بر ویژگی‌های زیستی زنبور ماده‌زای *Trichogramma brassicae* می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه تهران و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی در آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخنینگن هلند به انجام رسیده است.

1. Thelytokous parthenogenesis

REFERENCES

1. Almeida, R. P. (2004). *Trichogramma and its relationship with Wolbachia: Infection of Trichogramma species, phylogeny, transfer and costs of Wolbachia symbionts*. Ph. D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 142 pp.
2. Beard, C. B., O'Neill, S. L., Tesh, R. B., Richards, F. F. & Askoy, S. (1993). Modification of arthropods' vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today*, 9, 179–183.
3. Boleat, B., Lassabliere, F., Pintureau, B. & Grenier, S. (2000). Can *Trichogramma* males transmit *Wolbachia*? *Miscellania Zoologica*, 23, 3–8.
4. Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Markakis, G. & Savakis, C. (1996). *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics*, 144, 1063–1073.
5. Boyle, L., O'Neill, S. L., Robertson, H. M. & Karr, T. L. (1993). Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, 260, 1796–1799.
6. Braig, H. R., Guzman, H., Tesh, R. B. & O'Neill, S. L. (1994). Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367, 453–455.
7. 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.
8. Breeuwer, J. A. J. & Jacobs, G. (1996). *Wolbachia*: Intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental and Applied Acarology*, 20, 421–434.
9. Breeuwer, J. A. J. & Werren, J. H. (1993). Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, 135, 565–574.
10. Ciociola, Jr. A. I., de Almeida, R. P., Zucchi, R. A. & Stouthamer, R. (2001). Detecção de *Wolbachia* em uma população telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o Primer Específico *wsp*. *Neotropical Entomology*, 30, 489–491.
11. Ebrahimi, E. (1999). *Morphological and enzymatic study of the genus Trichogramma in Iran*. Ph. D. thesis. Tarbiat Modarres University, Iran, 149 pp. (In Farsi).
12. Enserink, M. (1997). Thanks to a parasite, asexual reproduction catch on. *Science*, 275, 1743.
13. Fujii, Y., Kageyama, D., Hoshizaki, S., Ishikawa, H. & Sasaki, T. (2001). Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: The feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 268, 855–859.
14. Grenier, S., Pintureau, B., Heddi, A., Lassablière, F., Jager, C., Louis, C. & Khatchadourian, C. (1998). Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265, 1441–1445.
15. Heath, B. D., Butcher, R. J., Whitfield, W. G. F. & Hubbard, S. F. (1999). Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a natural occurring mechanism. *Current Biology*, 9, 313–316.
16. Huigens, M. E. (2003). *On the evoluation of Wolbachia-induced parthenogenesis in Trichogramma wasps*. Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 183 pp.
17. Huigens, M. E., de 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 Society of London B*, 271, 509–515.
18. Huigens, M. E., Luck, R. F., Klaassen, R. H. G., Maas, M. F. P. M., Timmermans, M. J. T. N. & Stouthamer, R. (2000). Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405, 178–179.
19. Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., von der Schulenburg, J. H. G. & Fuyuma, Y. (2000). Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, 156, 699–709.
20. Jeyaprakash, A. & Hoy, M. A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9, 393–405.
21. Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D. & Majerus, M. E. N. (1988). Sex ratio distortion in *Acrea ensedon* is caused by a male killing bacterium. *Heredity*, 81, 87–91.
22. Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G., Hurst, G. D. D. & Majerus, M. E. N. (2001). Recombinations confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 268, 1423–1427.
23. Juchault, P., Rigaud, G. T. & Mocquard, J.P. (1992). Evolution of sex determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* (Crustaceae, Isopoda): competition between two feminizing parasite sex factors. *Heredity*, 69, 382–390.
24. Karr, T. L. (1994). Giant step sideways. *Current Biology*, 4, 537–540.
25. Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C. & Bandi, C. (2002). How many *Wolbachia* supergroups

exist? *Molecular Biology and Evolution*, 19, 341–346.
26. Majerus, M. E. N., Hindrich, J., Schulenburg, G. V. D. & Zakharov, I. A. (2000). Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinelidae) from Moscow. *Heredity*, 84, 605–609.
27. McGraw, E. A., Merrit, D. J., Droller, J. N. & O'Neill, S. L. (2002). *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2918–2923.
28. O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M. E., Karr, T. L. & Robertson, H. M. (1992). 16S RNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2699–2702.
29. Pinto, J. D. (1998). Systematics of the North American species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 22, 1–287.
30. Pinto, J. & Stouthamer, R. (1994). Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: E. Wajnberg & S. A. Hassan (Eds.), *Biological Control with Egg Parasitoids*. (pp. 1–36). CAB International, Wallingford.
31. Pintureau, B., Chaudier, S., Lassablière, F., Charles, H. & Grenier, S. (2000a). Addition of *wsp* sequences to the *Wolbachia* phylogeny tree and stability of the classification. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 374–377.
32. Pintureau, B., Grenier, S., Boleat, B., Lassabliere, F., Heddi, A. & Khatchadourian, C. (2000b). Dynamics of *Wolbachia* populations in transfected lines of *Trichogramma*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, 20–25.
33. Pintureau, B., Grenier, S., Heddi, A. & Charles, H. (2002). Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annales de la Societe Entomologique de France* (n.s.), 38, 333–338.
34. Pintureau, B., Louis, C. & Chapelle, L. (1993). Symbiose entre microorganisms et *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): intérêt pour la lutte biologique. *Bulletin of the Zoological Society of France*, 118, 159–167.
35. Rigaud, T. & Juchault, P. (1995). Success and failure of horizontal transfer of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *Journal of Evolutionary Biology*, 8, 249–255.
36. Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M. (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 250, 91–98.
37. Rousset, F. & de Stordeur, E. (1994). Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium *Wolbachia*. *Heredity*, 72, 325–331.
38. Schilthuizen, M. & Stouthamer, R. (1997). Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 264, 361–366.
39. 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.
40. Stouthamer, R. (1993). The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, 38, 3–6.
41. Stouthamer, R. (1997). *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann & J. H. Werren (Eds.), *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. (pp. 102–124). Oxford University Press, Oxford.
42. Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Luck, R. F. & Werren, J. H. (1993). Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361, 66–68.
43. Stouthamer, R. & Kazmer, D. J. (1994). Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73, 317–327.
44. Stouthamer, R. & Luck, R. F. (1993). Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 67, 183–192.
45. Stouthamer, R., Luck, R. F. & Hamilton, W. D. (1990). Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87, 2424–2427.
46. Stouthamer, R., Lükö, S. & Mak, F. (1994). Influence of parthenogenesis *Wolbachia* on host fitness. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 16 (Suppl.), 117–122.
47. Vandekerckhove, T. T. M., Watteyne, S., Willems, A., Swing, J. G., Mertens, J. & Gillis, M. (1999). Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiology Letters*, 180, 279–286.

48. van Meer, M. M. M. & Stouthamer, R. (1999). Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae). *Heredity*, 82, 163–169.
49. van Meer, M. M. M., van Kan, F. J. P. M. & Stouthamer, R. (1996). Can *Wolbachia* micro-injections induce parthenogenesis in sexual insects? *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)*, 7, 43–44.
50. Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. & Bouletreau, M. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1711–1723.
51. Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42, 587-609.
52. Werren, J. H. & Bartos, J. D. (2001). Recombination in *Wolbachia*. *Current Biology*, 11, 431–435.
53. Werren, J. H., Windsor, D. & Guo, L. R. (1995). Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 262, 197–204.
54. Zhong, M. & Shen, Z. (2004). Infection of the endosymbiont *Wolbachia* in population of *Trichogramma evanescens* in China. *Acta Entomologica Sinica*, 47, 732–737.