دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
www.entomologicalresearch.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد۵ ، شماره ۳، سال ۱۳۹۲، (۲۱۹-۲۳۶)

مطالعه گروه‌بندی باکتری *Wolbachia*، همزیست گونه‌های غالب زنبور *Trichogramma* در ایران

ریحانه درسوئی[۱]، جواد کریمی[۲]، وحید جهانبخش[۲]*

۱- دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- به‌ترتیب استادیار و مربی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

باکتری *Wolbachia* به‌عنوان یک همزیست درون سلولی (انگل تولیدمثلی) و تغییردهنده نسبت جنسی در گونه‌های مختلف *Trichogramma* شناخته شده است. با توجه به اهمیت این همزیست در برنامه‌های کنترل بیولوژیک، مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان کارایی ژن wsp در شناخت این همزیست و نیز شناخت میزان شیوع آن در برخی جمعیت‌های بومی زنبور *Trichogramma* انجام گرفت. در این بررسی که طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ انجام شد، از بین نوزده جمعیت تریکوگراما، هفت جمعیت، آلودگی به این باکتری همزیست را نشان دادند. تعداد هشت سویه از باکتری شناسایی شد که از این بین، شش سویه به بالا گروه A و زیرگروه Kue تعلق داشتند. دو سویه باقی مانده مربوط به بالاگروه B و زیرگروه Sib بودند. آلودگی دوگانه و چندگانه نیز در جمعیت‌های *Trichogramma* مشاهده شد. در بین سه گونه *T. embryophagum*، *T. evanescnes* و *T. brassicae*، بیشترین فراوانی *Wolbachia* در جمعیت‌های *T. brassicae* مشاهده شد. سوش‌های جمع‌آوری شده از استان مازندران بیشترین میزان آلودگی به *Wolbachia* را نشان دادند. با وجود تفکیک سویه‌های مختلف *Wolbachia* براساس ژن wsp، وجود نوترکیبی نشان داد که نتایج گروه‌بندی این همزیست با استناد به این ژن مورد تردید است.

آنالیز نوترکیبی وجود برخی تبادلات ژنتیکی بین سویه‌های مختلف این باکتری در ژن wsp را به‌وضوح نشان داد. رویکرد جدید با موضوع کاربرد چند ژن (سیستم MLST) می‌تواند در مطالعه دقیق‌تر این روابط راهکاری موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، *Wolbachia*، *Trichogramma*، wsp، نوترکیبی

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *jkb@um.ac.ir*

تاریخ دریافت مقاله (۹۰/۱۲/۲۲) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۹/۳۰)

مقدمه

مطالعه همزیست‌های حشرات رویکردی جدید در عرصه جهانی می‌باشد. این همزیست‌ها در کل، به دو گروه همزیست‌های اولیه و ثانویه تقسیم‌بندی می‌شوند (Harris *et al*., 2010). میکروارگانیسم‌های همزیست حشرات به گروه‌های مختلفی تعلق داشته و متداول‌ترین آن‌ها باکتری‌ها هستند. از مهم‌ترین باکتری‌های همزیست می‌توان به جنس‌های *Portiera*، *Buchnera*، *Wolbachia*، *Cardinium* و *Spiroplasma* اشاره کرد که دو جنس اول (به‌ترتیب) همزیست اولیه سفید بالک‌ها و شته‌ها و بقیه موارد، همزیست‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Harris *et al*., 2010). باکتری‌های همزیست ثانویه برخلاف همزیست‌های اولیه در باکتریوسیت قرار نداشته و وجودشان نیز برای تغذیه میزبان ضروری نمی‌باشد. این گروه، در سلول‌های بدن حشرات مستقر بوده و قادر نیستند آزادانه زندگی کنند (Novakova *et al*., 2009). باکتری *Wolbachia* جنسی از خانواده Rickettsiaceae (یا راسته Rickettsiales) است که در بسیاری از بندپایان و نماتدها، از طریق انتقال عمودی از مادر به‌نتاج منتقل می‌شود (Werren *et al*., 2008). این همزیست توارث سیتوپلاسمی داشته و در فرد ماده با استقرار در جوار میکروتوبول میزبان با بخش جلویی اووسیت‌ها در حین اووژنز ارتباط برقرار می‌نماید (Ferree *et al*., 2005). پراکنش این همزیست عموما در تخمدان و بیضه میزبان بوده اما علاوه بر اندام‌های تولیدمثلی، وجود آن در سایر بافت‌های بدن نظیر غدد بزاقی و اجسام چربی نیز به‌اثبات رسیده است (Clark *et al*., 2005). در کنار انتقال عمودی، انتقال افقی *Wolbachia* نیز شیوه‌ای مهم در انتقال و تغییر میزبان می‌باشد که در نهایت در بروز پاندمی موثر است (Baldo *et al*., 2006). شیوه برقراری ارتباط *Wolbachia* با میزبان، در مطالعه بیولوژی این همزیست حایز اهمیت است. این باکتری با تاثیر روی سلول‌های میزبان، اثرات فنوتیپی متفاوتی را سبب می‌شود که به‌صورت ماده‌زایی، نرکشی، ناسازگاری سیتوپلاسمی و تبدیل نرهای ژنتیکی به‌ماده بروز می‌کند (Stouthamer *et al*., 1994). هر یک از این تظاهرات، غالبا سبب افزایش فراوانی ماده‌های آلوده در جمعیت شده و بنابراین راهکاری برای انتقال همزیست محسوب می‌شود (Clark, 2007). عنوان «انگل تولیدمثلی» هم برگرفته از همین تاثیرات می‌باشد (Werren & O' Neil, 1997).. با توجه به‌سخت کشت بودن باکتری *Wolbachia*، ردیابی این پروکاریوت استفاده از روش qPCR و روش رنگ‌آمیزی FISH[1] و مشاهده میکروسکوپی (Hughes *et al*., 2011b) امکان‌پذیر است. در همین راستا، توسعه روش‌های مولکولی، پیشرفتی سریع در مطالعه این همزیست پدید آورده است. بررسی و مطالعات مولکولی در زمینه سویه‌های *Wolbachia*، نخستین‌بار با ژن 16S آغاز گردید (Breeuwer *et al*., 1992) اما به‌دلیل نرخ پایین جایگزینی در توالی این ناحیه و عدم تفکیک سویه‌های این باکتری در ادامه از ژن‌های ftsZ و به‌دنبال آن wsp که دارای نرخ تکاملی بالاتری هستند برای انجام این مهم استفاده شدند (Kikuchi & Fukatsu, 2003).

تاکنون مطالعه مولکولی انجام گرفته روی *Wolbachia*، به تقسیم بندی سویه‌های این باکتری در ۱۳ زیر گروه منجر شده است (Augustinos *et al*., 2011). رابطه *Wolbachia* با گروه‌های مختلف جانوری به‌این صورت است که بالاگروه‌های A و B با سه گروه عمده بندپایان (سخت‌پوستان، شش پایان و کلیسرداران)، C و D با نماتدهای فیلاریال (Casiraghi *et al*., 2005)، E با پادمان (Vandekerckhove *et al*., 1999)، F با برخی از شش‌پایان و نماتدها (Lo *et al*., 2002)، G با برخی عنکبوت‌ها (Rowley *et al*., 2004)، H با موریانه‌ها (Bordenstein & Rosengaus,

[1]- Fluorescent in situ hybridization

2005)، I و J به‌ترتیب با گونه‌هایی از کک‌ها (Casiraghi *et al.*, 2005؛ Gorham *et al*., 2003) و برخی از نماتدهای فیلاریال (*Dipetalonema gracile*) (Casiraghi *et al*., 2005) و بالا گروه K، با کنه‌های جنس Bryobia مرتبط می‌باشد (Ros *et al*., 2009). در سال ۲۰۱۱ میلادی نیز Augustinos و همکاران در مطالعه‌ای که در زمینه تعیین آلودگی به *Wolbachia* در جمعیت‌های مختلف شته‌ها انجام دادند دو بالاگروه جدید تحت نام M و N معرفی کردند این تعدد گروه‌های همزیست مذکور، تاییدی بر تنوع ژنتیکی بالای *Wolbachia* می‌باشد (Baldo *et al*., 2006).

مهم‌ترین رویکرد جهانی در زمینه مطالعه *Wolbachia*، به‌عرصه حشرات ناقل عوامل بیمارگر انسان و نیز فیلاریوزها مربوط می‌شود. مطالعات اخیر حاکی از این است که *Wolbachia* این توانایی را دارد تا حشره همزیست خود را در مقابل طیفی از عوامل بیمارگر محافظت نماید (Bian *et al*., 2010). در حال حاضر، برنامه‌های تحقیقاتی متعددی در دست اجرا می‌باشد تا در نهایت از طریق همزیستی ولباخیا–حشره، توانایی ناقل را در انتقال عوامل بیمارگری چون عامل مالاریا توسط *Anopheles* sp. (Hughes *et al*., 2011a) و تب دنگی از طریق *Aedes aegypti* (McMeniman & O'Niell, 2010) از بین ببرند. زمینه مهم دیگر، امکان درمان عفونت‌های نماتدی در انسان مثل آلودگی فیلاریوز توسط *Brugia malayi* Brug است. همزیستی اجباری *Wolbachia* با انگل مذکور این فرضیه را تداعی نموده که حذف Wolbachia در *B. malayi* می‌تواند راه‌کاری احتمالی در درمان این بیماری و بیماری‌های مشابه باشد (Dangi *et al*., 2009).

در عرصه کنترل بیولوژیک، همزیستی *Wolbachia* با دشمنان طبیعی در افزایش شایستگی (fitness) آن‌ها نقش به سزایی دارد. القای ماده‌زایی در زنبورهای پارازیتوییید علاوه‌بر افزایش میزان پارازیتیسم، کاهش هزینه‌های تولید انبوه را به‌دنبال خواهد داشت (Stouthamer *et al*., 1999). به‌علاوه، پیش بینی می‌شود که مسیرهای دیگری هم در جهت استفاده از هم‌زیستی ولباخیا-حشرات در راستای کنترل آفات گشوده شود که شامل مهار جمعیت (مشابه روش نر عقیمی) و نیز جایگزینی جمعیت‌ها باشد (Brelsfoard & Dobson, 2009). آلودگی به همزیست *Wolbachia* تاکنون در طیف گسترده‌ای از گونه‌های حشرات به اثبات رسیده است (Hilgenbocker *et al*., 2008). با توجه به‌نقش قابل توجه بال غشاییان به‌عنوان پارازیتوییید آفات، مطالعه عوامل موثر بر کارایی این عوامل، چشم‌اندازی نوین و امیدبخش در عرصه کنترل بیولوژیک می‌باشد. باکتری *Wolbachia* مهم‌ترین عامل تغییر نسبت جنسی به‌نفع ماده در گروه‌های مهمی از پارازیتوییدها می‌باشد. از میان پارازیتوییدها نقش زنبورهای *Trichogramma* در اکوسیستم‌های زراعی و باغی بیشتر از دیگر پارازیتوییدها در شرایط مشابه می‌باشد (Ashouri, 2001). زنبورهای *Trichogramma* ۱۸۰ گونه در جهان دارند (Pinto, 1999) که از بین آن‌ها ۹ درصد گونه‌ها آلوده به *Wolbachia* هستند (Almeida *et al*., 2010) و این آلودگی به دو صورت ماده‌زایی (Stouthamer *et al*., 1994) و افزایش زادآوری (Varve *et al*., 1999) نمایان می‌شود. با توجه به‌این که زنبورهای *Trichogramma* پارازیتوییدهایی مهم در برنامه‌های بیوکنترل می‌باشند (Li, 1994)، وجود همزیست *Wolbachia* و به‌دنبال آن تغییرات ایجاد شده در سیستم تولیدمثل، کاهش هزینه‌های تولید انبوه را به همراه خواهد داشت (Stouthamer *et al*., 1999).

در تحقیق حاضر، تلاش شده است تا تنوع زیستی سویه‌های *Wolbachia* ردیابی شده در زنبورهای *Trichogramma* بومی مناطقی از ایران با هدف مطالعه گروه‌بندی *Wolbachia* با استناد به‌توالی ژن wsp مورد بررسی قرارگیرد. در این راستا، بعد از مشخص شدن هویت همزیست پارازیتوییید تلاش گردید تا با روش‌های موجود، قابلیت

این ژن در مطالعه روابط بین گروه‌ها و زیرگروه‌های *Wolbachia* ارزیابی شود. دو فرض اصلی این مطالعه عبارت بودند از

۱) سویه‌های *Wolbachia* همزیست زنبورهای *Trichogramma* می‌توانند قرابت فیلوژنتیک چندانی با هم نداشته باشند

۲) نوترکیبی حاصل از انتقال جانبی ژن wsp سبب می‌شود که مطالعه روابط بین سویه‌های *Wolbachia* از منشا میزبان‌های مختلف، با استناد به این ژن چندان دقیق نباشد. در این مسیر علاوه بر ارایه اطلاعاتی در خصوص شیوع باکتری در جمعیت‌های *Trichogramma* مورد مطالعه، شناسایی مولکولی پارازیتویید میزبان نیز در دستور کار قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

منشا زنبورهای تریکوگرامای مورد استفاده در این بررسی، استان‌های خراسان رضوی، مازندران، گیلان، گلستان، تهران و قم بود که طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از انسکتاریوم‌ها و تخم‌های پارازیت شده پروانه‌ها از مناطق مذکور، جمع‌آوری گردید. نمونه‌های زنبور پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی و برمبنای مشخصات ظاهری افراد بالغ شناسایی و توسط Richard Stouthamer نیز تایید گردید.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA از کیت استخراج ژنومی بایونیر (با شماره کاتالوگ K-3032) استفاده شد. ابتدا ۲۰ فرد از هر نمونه از داخل الکل ۹۶ درصد روی کاغذ صافی منتقل شد تا الکل آن به‌طور کامل حذف شود. سپس، افراد داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. به‌منظور هر چه بهتر خرد شدن نمونه، میکروتیوب حاوی نمونه در حین خرد کردن به‌داخل نیتروژن مایع منتقل و سپس ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به‌تیوب حاوی نمونه اضافه شد. پس از این مرحله، نمونه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت چهار ساعت داخل بن ماری و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگه-داری شد. سایر مراحل استخراج با توجه به‌دستورالعمل کیت انجام گرفت و در نهایت DNA استخراج شده در دمای۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده، نگه‌داری شد.

تکثیر ناحیه ITS2 در زنبورهای *Trichogramma*

آغازگرهایی که برای تکثیر ناحیه ITS2 استفاده شد، شامل آغازگر مستقیم ITS-F (5´-TGTGAACTGCAGGACACATG-3´) و آغازگر معکوس ITS-R (5´-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3´) (Stouthamer *et al*., 1999) بود. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش عبارت بود از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر آغازگر مستقیم و ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase و ۱ میکرولیتر DNA الگو. برنامه دمایی واکنش

زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه و به‌دنبال آن، ۳۰ سیکل واکنش (واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۲ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه) بود و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۸ دقیقه انجام شد

ردیابی *Wolbachia*

برای ردیابی *Wolbachia* در زنبورهای *Trichogramma* از تکثیر ناحیه wsp استفاده گردید. بدین منظور از جفت آغازگر wsp-81F (5´-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3´) و wsp-691R (5´-AAAAATTAAACG CTACTCCA-3´) استفاده شد (Braig *et al*., 1998). این آغازگر با توجه به سویه *Wolbachia* قطعه‌ای به‌طول ۵۹۰ تا ۶۳۲ جفت باز تکثیر می‌کند (Zhou *et al*., 1998) واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش عبارت بود از ۳ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۶ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز و ۲ میکرولیتر DNA الگو. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه، به‌دنبال آن ۳۶ سیکل مراحل مختلف واکنش (واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در۴۸ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و گسترش در۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) انجام گرفته و در نهایت، گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. در این واکنش برای اطمینان از صحت تکثیر ژن مورد نظر، از گونه *Drosophila melanogaster* که آلوده به این همزیست می‌باشد، به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

الکتروفورز

به‌منظور مشاهده نواحی تکثیر شده، چهار میکرولیتر از محصول PCR در کنار نشان‌گر نردبانی ۱۰۰ جفت بازی روی ژل آگاروز یک درصد بارگذاری شد و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

توالی‌یابی

به‌منظور توالی‌یابی قطعات مورد نظر، ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر خالص و در نهایت، جهت توالی‌یابی به‌شرکت ماکروژن (http://www.macrogen.com) کره جنوبی ارسال شد. برای اطمینان، از هر جمعیت سه نمونه با هر دو آغازگر واکنش PCR توالی‌یابی شد.

استفاده از روش RFLP

توالی ITS2 به‌دست آمده برمبنای الگوی برش در شرایط in silico ارزیابی گردید. براساس نتایج به‌دست آمده و اطلاعات پیشین در خصوص آنزیم های برشی موثر در تفکیک گونه‌های Trichogramma (Sumer *et al*., 2009؛ Kumar *et al*., 2009)، آنزیم‌های برشی EcoRI، MseI و TaqI (فرمنتاز) به‌منظور مطالعه پروفیل حاصل از هضم آنزیمی انتخاب گردید. انجام واکنش برمبنای دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم انجام گردید و در نهایت محصول هضم شده روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

آنالیز داده‌ها

کروماتوگرام توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم افزار Bioedit (Hall, 1999) بررسی و در صورت نیاز ویرایش شد. بعد از اطمینان از صحت توالی‌ها، دو رشته توالی‌یابی شده مستقیم و معکوس توسط نرم افزار DNA Baser به یک رشته واحد تبدیل گردید. برای تعیین گروه‌بندی سویه‌های *Wolbachia*، توالی‌های مرتبط با ناحیه wsp از بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت و به‌همراه توالی‌های حاصل، توسط نرم افزار Clustal X (Larkin *et al*., 2007) هم‌ردیف شده و در آنالیز استفاده گردید (جدول ۱). سپس، از نرم افزار MEGA4 (Tamura *et al*., 2007) برای تعیین روابط تبارشناسی، از روش Neighbor joining (NJ) با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ (Felsenstein, 1985) و مدل جایگزینی نوکلئوتیدی K2P استفاده شد (Kimura, 1980). میزان نوترکیبی بین نژادهای مختلف Wolbachia توسط روش‌های Maxchi، Chimaera، Siscan، RDP، GENECONV، BootScan، PhylPro، LARD و 3Seq در نرم افزار RDP3 (Martin *et al*., 2005) محاسبه گردید. در این آنالیز، تمام تنظیمات به‌صورت پیش فرض در نظر گرفته شد. بالاترین مقدار P value معادل ۰/۰۱ و مقدار Variable site for windows نیز ۷۰ بود.

تعیین فراوانی *Wolbachia*

به‌منظور تعیین نرخ آلودگی *Trichogramma* به *Wolbachia*، آلودگی به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. بدین صورت که حضور باکتری با کد یک و عدم حضور با کد صفر مشخص شد. تفاوت در نرخ آلودگی در میان گونه‌ها و استان‌های مختلف توسط آزمون Kruskal-Wallis (Zar, 1999) محاسبه گردید و معنی‌دار بودن تفاوت‌ها با $P<0.05$ نشان داده شد. آزمون Dunn نیز برای مقایسه دوتایی مورد استفاده قرار گرفت. تمام آنالیزهای آماری براساس نرم افزار SPSS ver.19 محاسبه شد.

جدول ۱- فهرست گونه‌های *Trichogramma* که توالی ژن wsp آن‌ها در مطالعه حاضر به کار گرفته شده است.

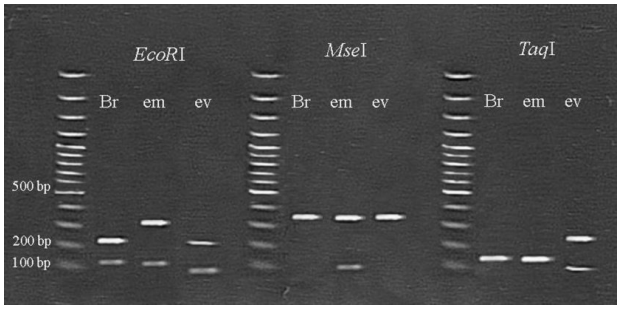
Table 1-The list of *Trichogramma* species and accession numbers of their wsp gene in current study.

Host	Accession numbers	Strain of wolbachia	origin
T. atopovirilia	FJ746073		Brazil
T. bourarachae	AF071913	wBou	Netherlands
T. brassicae	FJ441291	wBaT.bra	Iran
T. bruni	FJ746074		Brazil
T. cordubensis	AF245164	Grey	Portugal
T. deion	AF020084	wdei	USA
T. dendrolimi	AB094397	wDen Fukuyama	Japan
T. dendrolimi	DQ017752	wDen Tongliao	China
T. dendrolimi	DQ017750	wDen Weihe	China
T. dendrolimi	DQ017754	wDen Jiaohe	China
T. dendrolimi	DQ017751	wDen Qiqihae	China
T. embryophagum	AF245165	Uro3	Iran
T. evanescens	AF245167	M36	France
T. kaykai	AF071924	wKayB	Netherlands
T. nubilale	AF071926	wNub	Netherlands
T. oleae	AF245166	S2	Yugoslavia
T. ostriniae	AY633580	wOstC	China
T. ostriniae	FJ997917	wHLJYMT.o B	China
T. ostriniae	FJ997916	wHLJYMT.o A	China
T. ostriniae	FJ997911	wHBYMT.o A	China
T. ostriniae	EU403113	wOstDBWA	China
T. ostriniae	AY633578	wOstDBWA	China
T. ostriniae	EU157104	wOstGDAb	China
T. pratissolii	FJ746078	23	Brazil
T. pratissolii	FJ746079	25	Brazil
T. pretiosum	FJ746071	5	Brazil
T. semblidis	AF245162	Semv	France
T. turkestanica	DQ137265		Netherlands

نتایج

در واکنش PCR، ناحیه ITS2 زنبورهای *Trichogramma* همراه با نواحی مرزی 5.8S و 28S تکثیر شد و سپس توسط توالی‌های موجود در بانک ژن، مرز نواحی مشخص گردید. توالی ناحیه ITS2 در برخی گونه‌های مورد مطالعه با شماره دسترسی‌های HQ162663، HM214958، HQ332599، HQ332598، HQ343301، HM063427، HQ143679، HQ143678، HQ143677، HQ143675، HQ335390 در بانک ژن به‌ثبت رسید. این ناحیه توانست گونه‌های مختلف را با درصد شباهت زیاد از یکدیگر متمایز کند. در بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور گونه‌های *T. brassicae*، *T. evanscens* و *T. embryophagum* به‌ترتیب ده، هشت و یک جمعیت را به‌خود اختصاص دادند که *T. brassicae* به‌عنوان گونه غالب معرفی می‌شود.نتایج حاصل از RFLP نشان

داد که سه آنزیم EcoRI، MseI و TaqI قادرند سه گونه *T. embryophagum*، *T. brassicae* و *T. evanescens* را از یکدیگر متمایز کنند (شکل ۱). مقایسه الگوی برش ناحیه ITS2 توسط سه آنزیم *Eco*RI، *Mse*I و *Taq*I با نتایج قبلی که توسط Kumar و همکاران (۲۰۰۹) و Sumer و همکاران (۲۰۰۹) ارایه شده بود انطباق داشت.



شکل ۱- الگوی برش محصول PCR ناحیه ITS2 در گونه‌های *T. embryophagum* (em)، *T. brassicae* (br) و *T. evanescens* (ev)

Fig. 1- The restriction profile of PCR product of ITS2 region in *T. embryophagum* (em), *T. brassicae* (br) and *T. evanescens* (ev)

مطالعه رابطه تبارشناسی سویه‌های *Wolbachia* برمبنای ژن wsp

در بین جمعیت‌های *Trichogramma* بومی ایران آلودگی به‌همزیست *Wolbachia* با تکثیر ناحیه wsp در هفت جمعیت تعیین گردید (جدول ۲). بعد از تکثیر ناحیه مذکور، توالی‌های ژن wsp برای سویه‌های مختلف *Wolbachia* به‌دست آمد.

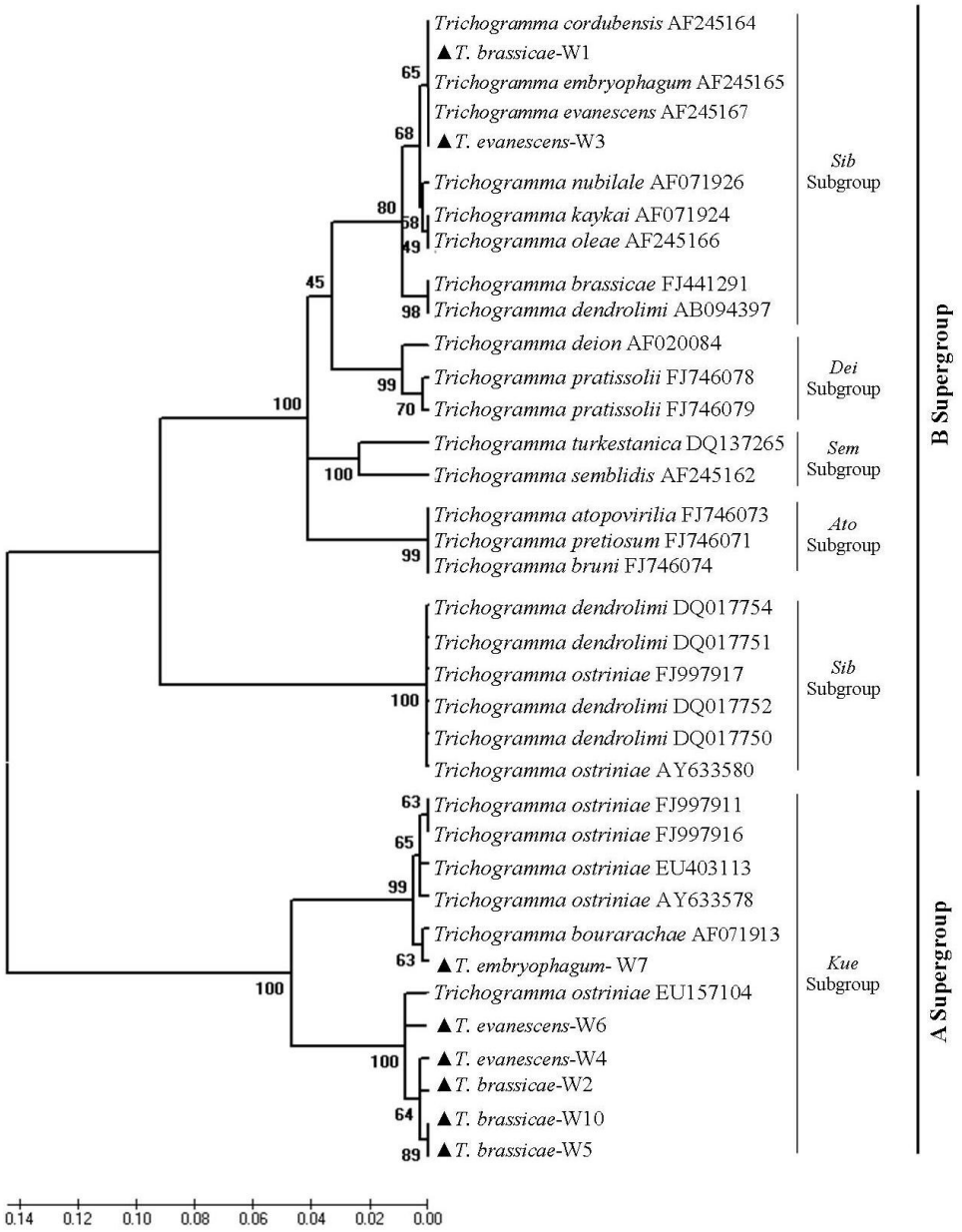
به‌منظور بازسازی تبارنمای سویه‌های *Wolbachia* براساس ژن wsp، ۲۸ توالی ژن مذکور از بانک ژن اخذ و در کنار هشت ایزوله ایرانی بررسی شد. در این آنالیز، ۴۵۸ نوکلئوتید هم‌ردیف شدند که از این بین ۲۶۹ نوکلئوتید حفاظت شده، ۱۸۹ نوکلئوتید متغیر و ۱۶۵ نوکلئوتید حاوی اطلاعات مفید بود.

در این آنالیز سویه‌های *Wolbachia* در دو بالا گروه A و B قرارگرفتند. بر این اساس، ۳۶/۸ درصد جمعیت‌های جمع‌آوری شده *Trichogramma* آلودگی به‌این همزیست را نشان داد که از این بین، سهم بالا گروه A و B به‌ترتیب ۷۷/۵ و ۲۲/۵ درصد بود. در این بررسی، سویه‌هایی از این باکتری که متعلق به بالاگروه A بودند در زیرگروه Kue و سویه‌های بالاگروه B در زیرگروه Sib قرارگرفتند (شکل ۲).

جدول ۲- مشخصات بررسی شده زنبور *Trichogramma* در این مطالعه، منطقه جغرافیایی آن‌ها و حضور *Wolbachia*

Table 2-The *Trichogramma* species, their geographic region and status of *wolbachia* infection

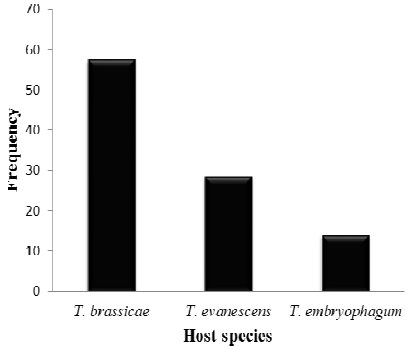
Host species	Province	Detection of *Wolbachia*	Host species	Province	Detection of *Wolbachia*
T. evanescens	Tehran	-	*T. brassicae*	Guilan	-
T. brassicae	Tehran	-	*T. embryophagum*	Razavi Khorasan	+W7
T. brassicae	Tehran	-	*T. evanescens*	Mazandaran	-
T. brassicae	Tehran	-	*T. evanescens*	Guilan	+W3
T. brassicae	Tehran	+W2	*T. evanescens*	Mazandaran	-
T. brassicae	Mazandaran	-	*T. evanescens*	Golestan	+W4 & W6
T. brassicae	Guilan	-	*T. evanescens*	Qom	-
T. brassicae	Mazandaran	+W10	*T. evanescens*	Qom	-
T. brassicae	Mazandaran	+W1	*T. evanescens*	Qom	-
T. brassicae	Mazandaran	+W5			



شکل ۲- گروه‌بندی سویه‌های مختلف *Wolbachia* براساس روش NJ و مدل دومتغیره‌ای K2P برمبنای توالی ژن wsp

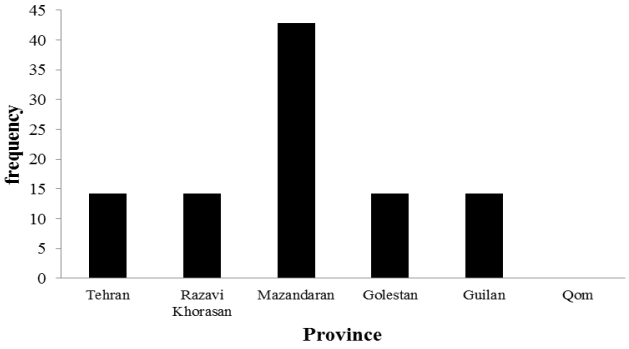
Fig. 2- Grouping of *Wolbachia* strains based on NJ method and K2P model using wsp sequences.

از بین سه گونه پارازیتویید، *T. brassicae* بیشترین فراوانی آلودگی به باکتری *Wolbachia* را به‌خود اختصاص داد (شکل ۳). از لحاظ جغرافیایی نیز استان مازندران بیشترین جمعیت‌های آلوده را دربرداشت (شکل ۴).



شکل ۳- فراوانی نسبی باکتری همزیست در گونه‌های مختلف *Trichogramma*

Fig. 3- The Prevalence of the *Wolbachia* endosymbiont within different species of *Trichogramma*



شکل ۴- فراوانی نسبی باکتری *Wolbachia* در استان‌های مورد مطالعه

Fig. 4-The prevalence of *Wolbachia* in different studied area

آنالیز نوترکیبی

آنالیز نوترکیبی بین سویه‌های مختلف *Wolbachia*، موید آن بود که بین ایزوله‌های W3، W5 و W7 که به‌ترتیب با گونه‌های *T. evanescens*، *T. brassicae* و *T. embryophagum* رابطه همزیستی داشتند، نوترکیبی وجود داشت. سویه W7 دارای پتانسیل نوترکیبی بوده و دو ایزوله W3 و W5 به‌ترتیب با پتانسیل کم و زیاد به‌عنوان والدین نوترکیبی تعیین شدند. در بین روش‌های استفاده شده برای انجام این آنالیز، فقط روش Maxchi درصدی از نوترکیبی را نشان داد. قطعه نوترکیب ۳۰۲ جفت باز طول داشت به‌طوری که عمل انفصال، از نوکلئوتید ۳۹۳ شروع و در محل نوکلئوتید ۹۱ پایان یافت.

بحث

تاکنون از ویژگی‌های مختلفی برای شناسایی زنبورهای *Trichogramma* استفاده شده است که بیشتر آن‌ها وابسته به خصوصیات ظاهری بوده است (Pinto, 1999; Stouthamer *et al*., 1999). در سال‌های اخیر، به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی که مبتنی‌بر توالی‌یابی DNA می‌باشند، رواج یافته است. تکنیک مولکولی که در این مطالعه به

منظور شناسایی زنبورهای *Trichogramma* به کار گرفته شد، برمبنای توالی‌یابی ناحیه ITS2 استوار بود. این ابزار محدودیت‌های روش‌های کلاسیک را که به‌ویژگی‌های ظاهری به‌ویژه ژنیتالیای جنس نر وابسته می‌باشند (Pinto *et al*., 1989) را ندارد. در این تحقیق، ناحیه مذکور به‌طور موفقیت‌آمیز گونه‌های مختلف جنس *Trichogramma* را از یکدیگر متمایز کرد. پیش از این نیز از این ناحیه بین ژنی برای تفکیک گونه‌های نزدیک در جنس *Trichogramma* استفاده شده بود (Stouthamer *et al*., 1999). علاوه‌بر این، Kumar *et al* (2009)، Ciociola *et al*. (2001) و Sumer *et al*. (2009) با استفاده از ناحیه ژنی مذکور و تکنیک RFLP به‌ترتیب برای گونه‌های *Trichogramma* بومی هندوستان، برزیل و نواحی مدیترانه کلید شناسایی مولکولی تهیه کردند.

برخی از گونه‌های *Trichogramma* آلوده به‌همزیست *Wolbachia* هستند و در برخی موارد از این ویژگی می‌توان به‌عنوان ابزاری برای تفکیک گونه‌های نزدیک به‌هم استفاده کرد (Pinttureau, 1997). دو گونه *T. embryophagum* و *T. cacoeciae* از نظر ظاهری بسیار به‌هم شبیه می‌باشند و به‌دلیل ماده‌زایی در این دو گونه، تراکم افراد نر بسیار پایین بوده و همین امر شناسایی آن‌ها را از روی ژنیتالیای جنس نر با مشکل مواجه کرده است. توالی ناحیه ITS2 این دو گونه نیز امکان تفکیک این دو گونه را میسر نمی‌سازد. هم‌چنین ماده‌زایی در افراد *T. cacoeciae* ژنتیکی بوده ولی در گونه *T. embryophagum* این تغییر در سیستم تولیدمثلی به‌وجود همزیست *Wolbachia* برمی‌گردد (Stouthamer *et al*., 1990; Pintureae, 1993). این همزیست در *T. caceoiae* وجود ندارد این درحالی است که *T. embryophagum* آلودگی بالایی به‌این همزیست را نشان داده است (Pintureau *et al*., 2002).

در سال‌های اخیر، مطالعه روی *Wolbachia* به‌صورت روندی جهانی درآمده است. عمده مطالعات انجام شده در جهت تعیین مشخصات سویه‌های این همزیست مستند به اطلاعات توالی ژن wsp بوده است (Werren & Bartos, 2001). این ناحیه نشان‌گری مهم به‌منظور گروه‌بندی و تعیین آلودگی *Wolbachia* در میزبان‌های مختلف بوده است (Casiraghi *et al*., 2005). کارکرد ژن مذکور کماکان نامعلوم مانده است اگر چه نظریاتی مبنی بر نقش احتمالی آن در برقراری رابطه میزبان همزیست وجود دارد (Braig *et al*., 1998).

در میان ۱۸۰ گونه *Trichogramma* که تاکنون توصیف شده‌اند، آلودگی به *Wolbachia* در ۲۰ گونه گزارش شده است (Pintureau, *et al*, 2002) که در این میان دو گونه *T. cordubensis* Vargas و *T. oleae* Voegele & Pointel به‌طور کامل (fixed) این آلودگی را نشان می‌دهند بدین صورت که تمام افراد جمعیت، ماده بوده و از طریق ماده‌زایی ازدیاد می‌یابند (Pintureau, *et al*, 2002). هجده گونه باقی مانده نیز در صورتی که *Wolbachia* به‌عنوان همزیست در جمعیت‌های آن‌ها حضور داشته باشد قادر به ماده زایی می‌باشند (Pintureau *et al*., 2002). در بین هجده گونه *Trichogramma* که آلودگی و حضور *Wolbachia* در جمعیت آن‌ها جزئی است (mixed)، پنج گونه آلودگی بالایی را از خود نشان می‌دهند که *T. embryophagum* از این گروه می‌باشد (Pintureau *et al*., 2002). شیوع همزیست در سیزده جمعیت باقی مانده این جنس محدود بوده و در مواردی، هیچ آلودگی در بین جمعیت‌ها مشاهده نمی‌شود (Pintureau *et al*., 2002). نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد که سویه‌های *Wolbachia* همزیست با *Trichogramma* در دو بالاگروه A و B جای می‌گیرند (Almeida, 2004; Pintureau *et al*., 2002). بیشترین تفاوت نوکلئوتیدی بین گروه‌های A و B، ۱۵ درصد گزارش شده است. این درحالی است که این تفاوت در بین سویه‌های درون بالاگروه A به ۳ درصد کاهش می‌یابد (Werren *et al*., 1995). ابتدا سویه‌های *Wolbachia* در زنبورهای *Trichogramma* در چهار زیرگروه Sib، Dei ، Kay و Kue دسته‌بندی شدند (Van Meer *et al*., 1999). سپس،

Pintureau و همکاران (۲۰۰۲) زیرگروه دیگری تحت نام Sem گزارش کردند که *Wolbachia* همزیست با گونه *T. semblidis* را در برداشت علاوه بر این، زیرگروه Sib و Kay را که تفاوتی کمتر از ۲/۵ درصد داشتند را با یکدیگر تلفیق کرده و تحت نام Sib معرفی کردند. Almeida در سال ۲۰۰۴ میلادی زیرگروه دیگری را تحت نام Ato معرفی کرد در این زیرگروه همزیست زنبور *T. atopovirilia* قرارداشت. لازم به ذکر است که زیرگروه Kue به بالاگروه A و سایر زیرگروه‌ها به بالاگروه B تعلق دارند. تاکنون مطالعات متعددی مبنی بر گروه‌بندی *Wolbachia* در زنبورهای *Trichogramma* انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که Pintureau و همکاران (۲۰۰۲) روی همزیست *Wolbachia* در این گروه از زنبورهای پارازیتویید انجام دادند تمام استرین‌های شناسایی شده *Wolbachia* در سه گونه *T. brassicae*، *T. evanescens* و *T. embryophagum* در بالاگروه B قرارگرفتند این در حالی است که در تحقیق حاضر، از بین هشت سویه تعیین شده این باکتری همزیست شش سویه که به گونه‌های *T. evanescens*، *T. brassicae* و *T. embryophagum* تعلق داشتند، در بالاگروه A در کنار ایزوله‌هایی از همزیست *T. ostirnae* قرارگرفتند. Poorjavad و همکاران (۲۰۱۲) استرینی از *Wolbachia* را در زنبور *T. brassicae* ردیابی کردند که در بالاگروه B قراگرفت و رابطه نزدیکی با *T. deion* نشان داد.

Wolbachia یکی از متداول‌ترین باکتری‌های همزیست درون سلولی می‌باشد (Hobbs *et al*., 1998) که اثرات متنوعی را روی میزبان خود سبب می‌شوند (Stouthamer *et al*., 1999). این چنین به‌نظر می‌رسد که *Wolbachia* برخی از مشخصه‌ها را برای میزبان خود بهبود می‌بخشد که در این بین می‌توان به‌افزایش طول عمر زنبور *Trichogramma* در غیاب میزبان و افزایش توان پراکندگی در شرایط طبیعی و نه در محیط آزمایشگاهی اشاره کرد (Pintureau *et al*., 2002). بنابراین، شناخت دقیق تاثیر *Wolbachia* روی زنبور میزبان، می‌تواند در مسیر کنترل بیولوژیک و انتخاب مناسب‌ترین جمعیت عامل کنترل، مفید باشد (Stouthamer, 1993).

همان‌طور که اشاره شد، ژن wsp به‌طور گسترده برای طبقه‌بندی مولکولی جنس *Wolbachia* استفاده شده است (Zeh *et al*., 2005; Casiraghi *et al*., 2005). اما مسایل متعددی این ژن را برای تعیین بالاگروه‌ها نامناسب کرده است (Baldo *et al*., 2006). یکی از مهم‌ترین این مسایل، نوترکیبی داخل ژنی بین بالاگروه‌ها است که موجب نامناسب بودن معیارهای فعلی برای تعیین بالاگروه‌ها شده است (Baldo & Werren, 2007). در مورد ژن wsp، علاوه‌بر انتقال عمودی در برخی مواقع انتقال افقی نیز مشاهده می‌شود (Huigens *et al*., 2000). نتیجه انتقال افقی می‌تواند آلودگی دو یا سه گانه را به‌همراه داشته باشد (Huigens *et al*., 2000). این پدیده زمانی بروز می‌کند که زنبورهای آلوده به سویه‌های مختلف *Wolbachia* در یک میزبان تخم‌ریزی می‌کنند (Werren, 1997). بیش از ۲ درصد گونه‌های آلوده به همزیست مذکور آلودگی چندگانه دارند (Werren *et al*., 1995). این نوع آلودگی، امکان بروز نوترکیبی بین سویه‌های مختلف *Wolbachia* را میسر می‌سازد (Huigens *et al*., 2000). در برخی سویه‌های مختلف این باکتری، مواردی از تبادل DNA در ژن wsp مشاهده شده است (Werren & Jiggins *et al*., 2001; Bartos, 2001). همین امر سبب شده که بررسی انواع سویه‌ها با اکتفا به یک ژن چندان قابل اعتماد نباشد (Werren & Bartos, 2001; Jiggins *et al*., 2001). مکانیسم نوترکیبی به نحوی است که DNA خارجی به جای DNAاصلی در نواحی که بیش از حد متغیر هستند درون یک ژنوم واحد جا به‌جا می‌شود اما حالات این انتقال DNA، در *Wolbachia* تا کنون ناشناخته باقی مانده است. ضمن این‌که وقوع گسترده آلودگی‌های مشترک در یک میزبان به‌وضوح، یک عرصه مناسب را برای این نوع تبادلات فراهم آورده است (Baldo *et al*., 2005). وجود نوترکیبی در

ژن wsp، استفاده از آن را به‌تنهایی در مطالعات مربوط به‌تعیین مشخصات و گروه‌بندی *Wolbachia* با چالش مواجه کرده است (Baldo *et al*., 2005). نوترکیبی به‌صورت مشخص درون سویه‌های یک بالاگروه (Baldo *et al*., 2005) و به‌ندرت بین سویه‌های متعلق به بالاگروه‌های مختلف (Baldo & Werren, 2007) مشاهده شده و این رخداد، میزان اطمینان به‌گروه‌بندی جدایه‌های *Wolbachia* با استناد به ژن مذکور را کاهش داده است (Baldo *et al*., 2005). گرچه جهش‌هایی که در wsp رخ می‌دهد، دارای فرکانس بالاتری از نوترکیبی است اما انتظار می‌رود که نوترکیبی به‌مراتب تاثیر قابل توجه‌تری در ظهور انواع پروتئین و افزایش بسیار سریع تنوع در میان پروتئین‌ها را به‌همراه داشته باشد (Baldo *et al*., 2006). علاوه‌بر این، نوترکیبی در ژن gltA (Baldo *et al*., 2006)، wsp، ftsZ و gltA (Jiggins, 2002; Reuter & Keller, 2003; Keller *et al*., 2004; Verne *et al*., 2007) و ژن 16S (Ros *et al*., 2009) در *Wolbachia* گزارش شده است. به‌طور کلی، استفاده از ژن wsp با فرض این‌که نوترکیبی بین بالاگروه‌های مختلف رخ ندهد قابل قبول خواهد بود. با این حال چند مورد، استفاده از ژن wsp را برای تعیین بالاگروه‌ها با چالش مواجه نموده است (Baldo *et al*., 2006; Baldo & Werren, 2007): اول این‌که نوترکیبی بین سویه‌های بالاگروه‌های مختلف به احتمال زیاد بیش از حد انتظار رخ می‌دهد و دوم، روش‌های کنونی برای تعیین تیپ بالاگروه‌ها، فاقد معیارهای استاندارد می‌باشند. سویه‌های مختلف منتسب به بالاگروه‌های A و B در مطالعات گذشته به‌عنوان مرجع در مطالعات حاضر استفاده می‌شوند. این درحالی است که احتمال اشتباه در تعیین بالاگروه‌های این مراجع وجود خواهد داشت. عوامل مذکور و تنوع زیاد ژن wsp، تعیین زیرگروه و بالاگروه‌ها را در *Wolbachia* با استفاده از این ژن نامعتبر می‌کند (Baldo & Werren, 2007). در این راستا، رهیافت موثر، کاربرد چند ناحیه ژنی به جای یک ژن می‌باشد. این رویکرد MLST[1] نام داشته که در آن از مشخصات چند لوکوس به‌صورت هم‌زمان برای تعیین «تیپ[2]» جدایه *Wolbachia* استفاده می‌شود (Baldo *et al*., 2006). این سیستم در سال‌های اخیر رواج یافته و رویکردی استاندارد و بدون ابهام است که می‌توان از آن به‌طور گسترده برای تعیین جایگاه و تیپ‌بندی همزیست‌هایی چون *Wolbachia* بهره گرفت (Sintupachee *et al*., 2006; Zeh *et al*., 2005; Haine & Cook, 2005 و Malloch & Fenton, 2005). در مورد گروه‌های مختلف باکتری‌ها و از جمله گروه‌های همزیست، تعداد نواحی مورد استفاده، متغیر است هر چند شناخته شده‌ترین این ژن‌ها، پنج ژن خانه داری[3] می‌باشند که عبارتند از gatB، CoxA، hcpA، ftsZ و fbpA (Baldo *et al*., 2006).

مطالعه میزان تفاوت نوکلئوتیدی ناحیه wsp سویه‌های ایرانی *Wolbachia* منجر به ارایه نتایجی در این بررسی گردید که لازم است با استفاده از رویکرد جدید مبتنی بر چند لوکوس (MLST)، این بررسی تکمیل شود تا برخی ابهامات موجود مرتفع گردد

سپاسگزاری

هزینه اجرای این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (طرح مصوب شماره ۱۴۹۰۶) تامین شده که بدین وسیله قدردانی می‌شود. از همکاری Richard Stouthamer، Paul de Almeida و Paul Rugman

[1] Multi Locus Sequence Typing
[2] . Type
[3]. Housekeeping gene

Jones در مراحلی از انجام پژوهش، قدردانی می شود. دکتر مجتبی حسینی در آنالیز برخی داده‌ها یاری رساندند که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

References

Agustinos, A. A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A. F., Borges, P. A. V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G. and Bourtzis, K. 2011. Detection and Characterization of *Wolbachia* Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled?. Plos one. 6 (12): 1-11.

Almeida, R. P. 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. PhD thesis. Wageningen university, (142 pp.):

Almeida, R. P. and Stouthamer, R. 2003. Systematic, Morphology and Physiology, Identification of *Trichogramma* cacoeciae Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A New Record for Peru. Neotropical Entomology, 32(2): 269–272.

Almeida, R. P., van Lenteren, J. C. and Stouthamer, R. 2010. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma* atopovirilia behaviour?. Brazilian Journal of Biology, 70(2): 435–442.

Ashouri, A. 2011. Production and Commercial Use of Biological Control Agents in Worldwide and Iran. Proceedings of Biological Control Development Congress in Iran. 26- 27 July. Pp: 244–253.

Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C., Tettelin, H. and Werren, J. H. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Applied and Environmental Microbiology, 72: 7098–7110.

Baldo, L., Lo, N. and Werren, J. H. 2005. Mosaic nature of wsp (Wolbachia surface protein). Journal of Bacteriology, 87: 5406–5418.

Baldo, L. and Werren, H. J. 2007. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on WSP: Spurious. Lineages and Discordance with MLST. Current Microbiology, 55: 81–87.

Bian, g., Xu, y., Lu, p., Xie, y. and Xi, Z. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in Aedes aegypti. PLoS Pathogen, 6: e1000833.

Bordenstein, S. R., Paraskevopoulos, C., Hotopp, J. C., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., Tettelin, H., Werren, J. H. and Bourtzis, K. 2009. Parasitism and mutualismin *Wolbachia:* what the phylogenomic trees can and cannot say. Molecular Biology and Evolution, 26: 231–241.

Bordenstein, S. and Rosengaus, R. B. 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. Current Microbiology, 51: 393–398.

Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. L. and O'Neill, S. L. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Journal of Bacteriology, 180(9): 2373–2378.

Breeuwer, J. A. J., Stouthamer, R., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Weisburg, W. G. and Werren, J. H. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. Insect molecular biology,I: 25–36.

Brelsfoard, C. L. and Dobson, S. L. 2009. *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 17(3): 55–63.

Casiraghi, M., Bordenstein, S. R. and Baldo, L. 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on gltA, groEL and ftsZ gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the

F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. Microbiology, 151: 4015–4022.

Ciociola, J. R. A. I., Zucchi, R. A. and Stouthamer, R. 2001. Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. Neotropical Entomology, 30: 259–262.

Clark, M. 2007. *Wolbachia* Symbiosis in Arthropods. In *Wolbachia*: A Bug's Life in another Bug (Clark, M. Hoerauf A, Rao RU). *Wolbachia*. Issues in Infectious Diseases. Basel, Karger, 5: 90–123.

Clark, M. E., Anderson, C. L., Cande, J. and Karr, T. L. 2005. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. Genetics, 170: 1675– 1667.

Dangi, A., Vedi, S., Nag, J. K, Paithankar, S., Singh, M. P., Kar, S. K., Dube, A. and Misra-Bhattacharya, S. 2009. Tetracycline treatment targeting *Wolbachia* affects expression of an array of proteins in Brugia malayi parasite. Proteomics, 9(17): 4192–4208.

Felsenstein, J. 1985. Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783–791.

Ferree, P. M., Frydman, H. M., Li, J. M., Cao, J., Wieschaus, E. and Sullivan, W. 2005. *Wolbachia* Utilizes Host Microtubules and Dynein for Anterior Localization in the *Drosophila* Oocyte. PloS Pathogens, 2(1): 111–124.

Gorham, C. H., Fang, Q. Q. and Durden, L. A. 2003. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). International Journal for Parasitology, 89: 283–289.

Haine, E. R. and Cook, J. M. 2005. Convergent incidences of *Wolbachia* infection in fig wasp communities from two continents. Proceedings. Biological Sciences, 272(1561): 421–429.

Hall, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Journal of Nucleic Acids, 41: 95–98.

Harris, H. L., Brennan, L. J., Keddie, B. A. and Braig, H. R. 2010. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. Symbiosis, 51: 37–53.

Hilgenbocker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. and Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. FEMS Microbiology Letters, 281: 215–220.

Hobbs, M. M., Malorny, B., Prasad, P., Morelli, G., Kusecek, B., Heckels, J. E., Cannon, J. G. and Achtman, M. 1998. Recombinational reassortment among opagenes from ET-37 complex Neisseria eningitidis isolates of diverse geographical origins. Microbiology, 144 (1): 157–166.

Hughes, G. L., Koga, R., xue, P., Fukatsu, T. and Rasgon, J. L. 2011 (a). *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. PLoS Pathogens, 7 (5): 1–11.

Hughes, G. L., Ren, X., Ramirez, J. L., Sakamoto, J. M., Bailey, J. A., Jedlicka, A. E and Rasgon, J. L. 2011(b). *Wolbachia* Infections in *Anopheles gambiae* Cells: Transcriptomic Characterization of a Novel Host-Symbiont Interaction. PLoS Pathogens, 7 (2): 1–11.

Huigens, M., Luck, R., Klaassen, R., Maas, M., Timmermans, M. and Stouthamer, R. 2000. Infectious parthenogenesis. Nature, 405: 178–179.

Jiggins, F. M. 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. Molecular Biology and Evolution, 19: 1640–1643.

Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G., Hurst, G. D. D. and Majerus, M. E. N. 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. Proceedings of the Royal ociety B: Biological Sciences. London. B. 268: 1423–1427.

Keller, G. P., Windsor, D. M., Saucedo, J. M. and Werren, J. H. 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). Molecular Ecology, 13: 2405–2420.

Kikuchi, Y. and Fukatsu, T. 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. Applied and Environmental Microbiology, 69: 6082–6090.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16 (2): 111–120.

Kumar, G. A., Jalali, S. K., Venkatesan, T., Stouthamer, R., Niranjana, P. and Lalitha, Y. 2009. Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS2-RFLP) tool to differentiate some exotic and indigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. Biocontrol, 49, 207–213.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947–2948.

Li, L. Y. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. in: E. Wajnberg & S.A. Hassan (eds.), Biological control with egg parasitoids, p. 37–53. Cab International: Oxon ,UK.

Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C. and Bandi, C. 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? Molecular Biology and Evolution, 19: 341–346.

Malloch, G. and Fenton, B. 2005. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. Molecular Evolution, 14: 627–637.

Martin, D., Williamson, C. and Posada, D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. Bioinformatics, 21: 260–262.

McMeniman, C. J. and O'Neill, S. L. 2010. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector Aedes aegypti during periods of embryonic quiescence. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(7): e748.

Novakova, E., Hypsa, V. and Moran, N. A. 2009. Arsenophonus, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. BMC Microbiology, 9: 143.

Pinto, J. D. 1999. The systematics of the North American species of *Trichogramma*. Memoirs of the Entomological Society of Washington, 22, 287p.

Pinto, J. D., Velten, R. K., Platner, G. R. and Oatman, E. R. 1989. Phenotypic plasticity and taxonomic characters in *Trichogramma*. Annals of the Entomological Society of America, 85, 413–422.

Pintureau, B. 1993. Enzymatic analysis of the genus *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) in Europe. Entomophaga, 38: 411–431.

Pintureau, B. 1997. Systematic and genetical problems revised in two closely related species of *Trichogramma*, *T. embryophagum* and *T. cacoeciae* (Hym. Trichogrammatidae). Museu de Zoologia, 20(2): 11-18.

P**intureau, B., Grenier, S., Heddi, A. and Charles, H. 2002.** Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Annales de la Société Entomologique de France, 38: 333–338.

Poorjavad, N., Goldansaz, S. H., Machtelinckx, T., Tirry, L., Stouthamer, R. and van Leeuwen, T., 2012. Iranian *Trichogramma*: ITS2 DNA characterization and natural *Wolbachia* infection. BioControl. 57 (3): 361 – 374.

Reuter, M. and Keller, L. 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant Formica exsecta. Molecular Biology and Evolution, 20: 748–753.

Ros, V. I., Fleming, V. M., Feil, E. J. and Breeuwer, J. A. 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? ultiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). Applied and Environmental Microbiology, 75: 1036–1043.

Rowley, S. M., Raven, R. J. and McGraw, E. A. 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. Current Microbiology, 49: 208–214.

Saridaki, A. and Bourtzis, K. 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. Current Opinion in Microbiology, 13: 67–72.

Sintupachee, S., Milne, J. R. and Poonchaisri, S. 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. Microbial Ecology. 51: 294–301.

Stouthamer, R. 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. Entomophaga, 38: 3–6.

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J. and Hurst, G. D. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology, 53: 71–102.

Stouthamer, R., Luck, R. F. and Hamilton, W. D. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert to sex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 2424–2427.

Stouthamer, R., Luko, S. and Mak, F. 1994. Influence of parthenogenesis *Wolbachia* on host fitness. Norwegian journal of agricultural sciences supplement, 16: 117–122.

Sumer, F., Tuncbilek, A., Oztemiz, S., Pintureau, B., Rugman-Jones, P. and Stouthamer, R. 2009. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. Biocontrol, 54: 617–624.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596–1599.

Vandekerckhove, T. T. M., Watteyne, S., Willems, A., Swing, J. G., Mertens, J. and 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.

van Meer, M. M. M., Witteveldt, J. and Stouthamer, R. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the wsp gene. Insect Molecular Biology, 8: 399–408.

Varve, F., Girin, C. and Bouletreau, M. 1999. Phylogenetic status of a fecundity enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. Insect Molecular Biology, 8: 67–72.

Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. and Grandjean, F. 2007. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus Armadillidium. Gene, 397: 58–66.

Werren, J. H. 1997. Biology of Wolbachia. Annual Review of Entomology, 42: 537–609.

Werren, J. H. and Bartos, J. 2001. Recombination in *Wolbachia*. Current Biology, 11: 431–435.

Werren, J. H. and O'Neil, S. 1997. The evolution of heritable symbionts; in: O'Neil S, Hoffmann A. A, Werren. J. H. (eds): Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press, New York. Pp 1-41.

Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology, 6: 741–751.

Werren, J. H., Windsor, D. and Guo, L. R. 1995. Distribtion of Wolbachia among neotropical arthropods. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 262: 197–204.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis 4th edition. Prentice-Hall, New Jersey. 663 pp.

Zeh, D. W., Zeh, J. A. and Bonilla, M. M. 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the 16 harlequin beetle riding pseudoscorpion. Heredity, 95: 41–49.

Zhou, W., Rousset, F. and ONeill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 265: 509–551.

Journal of Entomological Research
Volume 5, Issue 3, pages: 219-236

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
www.entomologicalresearch.ir

Wolbachia grouping study, in major *Trichogramma* wasps in Iran

R. Darsouei[1], J. Karimi[2*], V. Jahanbakhsh[2]

1- PhD student of Agriculture Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Respectively Assistant Professor and Lecturer, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

The intracellular symbiont bacterium, *Wolbachia* is known as a reproductive parasite in different species of *Trichogramma*. Regard to importance of this symbiont in biological control programms, the present study addressed the efficiency of wsp gene to typing this symbiont from some populations of *Trichogramma* and also its prevalence. In this study which conducted through 2009 to 2010, 19 populations of *Trichogramma* were screened for *Wolbachia* infection. Among these, seven populations were determined as infected by *Wolbachia*. Eight strains of the bacterium were characterized which six strains belonged to subgroup Kue from A supergroup. The two remained strains were related to B supergroup and Sib subgroup. The double infection and superinfection were observed in *Trichogramma* populations. Among three species, *T. embryophagum*, *T. brassicae* and *T. evanescens*, the highest prevalence of *Wolbachia* was observed in *T. brassicae* with 57 % of samples populations. The most infection rate belonged to populations of Mazandaran province. Despite the separation of different strains of *Wolbachia* on the basis of wsp gene, recombination analysis indicated a doubt about the grouping results of this symbiont inferring from this gene. This analysis indicated existence of some genetic exchangesbetween different strains of *Wolbachia* in wsp gene. The new approach called Multilocus Sequence Typing (MLST system) could be effective solution in more accurate characterization of these endosymbionts.

Key words: Phylogeny, *Wolbachia, Trichogramma*, *wsp*, Recombination

* Corresponding Author, E-mail: *jkb@um.ac.ir*
Received:13 Mar. 2012 - Accepted: 20 Dec. 2012