

یادگیری و دوام حافظه زنبور *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) آلوده به باکتری *Wolbachia*

حسین کیشانی فراهانی^۱، احمد عاشوری^{۲*}، سید حسین گلدان‌ساز^۳، مارتین شاپیرو^۴، اکبر گلشنی^۵ و پوریا آبرون^۶
۱، ۵ و ۶، به ترتیب دانشجوی دکتری، کارشناسی و کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و
منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۲ و ۳، به ترتیب استاد و دانشیار بخش حشره شناسی گروه گیاهپزشکی پردیس
کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، دانشیار بخش رفتارشناسی دانشگاه کالیفرنیا
(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۲/۱۹)

چکیده

توانایی یادگیری و به خاطر سپردن نشانه‌های مرتبط با حضور شکار و یا میزبان از عوامل موثر در افزایش کارایی و قدرت جستجوگری دشمنان طبیعی همچون پارازیتوئیدهای تخم از جمله زنبورهای *Trichogramma* در طبیعت می‌باشد. زنبور *Trichogramma brassicae* در ایران گونه‌ی غالب در بین گونه‌های مختلف جنس *Trichogramma* بوده و بیشترین گسترش را در مناطق مختلف ایران دارا است. هم‌چنین هر دو سوش آلوده و غیر آلوده این گونه به باکتری *Wolbachia* توامان از پرکاربردترین پارازیتوئید تخم در برنامه‌های کنترل بیولوژیک حال حاضر ایران است. زنبورهای حاوی و یا آلوده به باکتری *Wolbachia* بدون جفت‌گیری تولید نتاج ماده می‌کنند، زیرا این باکتری یک همزیست درون سلولی و عامل القا کننده بکر-ماده‌زایی در برخی از حشرات از جمله زنبورهای تریکوگراما می‌باشد. در این پژوهش توانایی یادگیری بویایی زنبور *T. brassicae* آلوده به باکتری *Wolbachia* نسبت به دو رایحه بویایی نعنار و لیمو در شرایط کنترل‌شده‌ی آزمایشگاهی با استفاده از تونل باد بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بعد از شرطی‌سازی زنبورهای ماده، بین پاسخ‌های بویایی آن‌ها با نشانه‌های بویایی غیرشرطی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین دوام حافظه زنبورهای ماده تا ۱۲ ساعت بعد از شرطی‌سازی و در غیاب تجربه برخورد با نشانه فراگرفته شده ادامه می‌یابد. شناخت توانایی یادگیری و دوام حافظه در دشمنان طبیعی از جمله زنبور *T. brassicae* و همچنین کشف تاثیر احتمالی همزیست‌ها بر توانایی‌های جانور می‌تواند ضمن بسط و گسترش دانش بشری از وقایع پیراون خود باعث کاربرد موفق‌تر حشرات مفید در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات گیاهی گردد.

واژه های کلیدی: دوام حافظه، کارایی، تجربه، قدرت جستجوگری، *Wolbachia*، *Trichogramma brassicae*

مقدمه

باعث به وجود آمدن رفتارهای تکاملی ویژه‌ای در پارازیتوئیدها و حشرات میزبان شده است. به همین دلیل پارازیتوئیدها در مقابل رفتارهای میزبان‌ها

برهم‌کنش‌های ناشی از رفتار میزبان‌یابی میان میزبان-پارازیتوئید و در نتیجه اجتناب از پارازیتسیم

بررسی توانایی یادگیری روی بیش از ۳۶ گونه از بال غشاییان انجام شده است (Begum et al. 2004). هر چند که جنس‌های *Asobara*، *Agrochrysis*، *Cotesia*، *Compolitis*، *Bracon*، *Brachymeria*، *Leptopilina*، *Itopectis*، *Exeristes*، *Diaeretiella* می‌توان در بین فهرست زنبورهای مورد مطالعه مشاهده کرد (Chow and Mackauer 1992, Godfray and Waage 1988, Guerrieri et al. 1997, Kaiser and Jong 1993, Lewis and Tumlinson 1988, Papaj and Vet 1990, Sheehan and Shelton 1989, Turlings et al. 1993, Vet et al. 1991, Wackers and Lewis 1991, Langley et al. 2006, Segura et al. 2007, Meiners et al. 2003) ولی از جنس *Trichogramma* به عنوان یکی از پرکاربردترین عوامل کنترل بیولوژیک، گزارش کمتری به چشم می‌خورد (Kruidhof et al. 2012).

باکتری *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 می‌شوند (Cordaux et al. 2004, Goodacre et al. 2008, Werren et al. 2006). این نوع باکتری‌های همزیست داخلی جز آلفا پروتئوباکتیریا بوده و بافت‌های مختلفی از بدن بندپایان را آلوده می‌کنند. باکتری‌های مزبور به دلیل اینکه با ایجاد تغییراتی در سیستم تولیدمثل میزبان باعث افزایش انتقال عمودی (مادر به دختر) و وراثت‌پذیری خود می‌شوند، بیشتر مورد توجه محققین بسیاری واقع شده‌اند. این تغییرات شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی در برخی خرچاکی‌ها، حشرات، کنه‌ها، ماده‌سازی با تغییر وضعیت ژنتیکی نرها و تبدیل آن‌ها به ماده‌های کارآمد در خرچاکی‌ها، کشتن نرها در تعدادی از دوبالان، سخت‌بال‌پوشان و بال‌پولکداران از طریق جنین نر و القای بکرزایی در حشرات پارازیتوئید می‌باشد (Hurst et al. 1999, Hoffman and Turelli 1997, Sinkins 2004, Jeong and Suh 2008, Werren et al. 2008, Taylor et al. 2005). باکتری *Wolbachia* در بیش از ۷۰ گونه از زنبورهای پارازیتوئید مشاهده شده است ولی تخمین زده می‌شود که ۱۸ گونه از ۱۸۰ گونه زنبور پارازیتوئید جنس *تریکوگراما* به این باکتری آلوده باشند (Cook & Butcher 1999). تحقیقات مختلفی به مطالعه‌ی ویژگی‌های زیستی و رفتاری

استراتژی‌های جستجوگری خود را بر اساس نشانه‌ها و محرک‌های مختلف محیطی پایه‌گذاری می‌کنند (Papaj and Lewis 1993). از میان حواس چندگانه، پارازیتوئیدها برای یافتن میزبان‌های خود، بیشترین استفاده را از محرک‌های بویایی و به خاطر سپردن علائم ناشی از آن دارند (Wajnberg and Colazza 2013).

بر خلاف تصور عموم قدرت یادگیری نشانه‌های مختلف تنها منحصر به موجودات پیشرفته مخصوصاً پستانداران نیست و این فرآیند در تمامی موجودات، از موجودات تک سلولی تا پرسلولی نظیر پستانداران، به صورت‌های مختلف رخ می‌دهد. یادگیری نشانه‌های متفاوت طی دوره‌های مختلف رشدی موجودات زنده، در طیف وسیعی از بی‌مهرگان همچون نماتدها، حلزون‌ها، ایزوپودها و حتی موجوداتی مانند پارامسی‌ها نیز مطالعه شده است (Segura et al. 2006, Smid and Vet 2006). در مورد حشرات نیز مانند بسیاری از موجودات دیگر، مطالعاتی در این زمینه انجام شده است و به نظر می‌رسد که قدرت یادگیری تا حد زیادی در افزایش کارایی رفتارهای مرتبط با یافتن غذا و مکان‌های جفت‌گیری موثر باشد (van Baaren and Boivin 1998).

عوامل زنده و ذاتی، علاوه بر عوامل مختلف محیطی، در یافتن میزبان و استفاده از آن و در نتیجه میزان توقف پارازیتوئید در محل زندگی میزبان (Patch) تاثیر دارد (van Alphen et al. 2003). از جمله عوامل تاثیرگذار در مدت زمان باقی‌ماندن در محل زندگی میزبان، وضعیت فیزیولوژیکی جنس ماده مانند سن، کیفیت تغذیه، جفت‌گیری و حضور رقیب در محل زندگی میزبان می‌باشد (Louapre et al. 2011, Corley et al. 2010, Goubault et al. 2005); این در حالی است که تجربه قبلی برخورد با میزبان و وقوع پارازیتیسیم توسط زنبورهای ماده از عوامل مهم و تاثیرگذار بر زمان بهره‌برداری از محل زندگی میزبان می‌باشد. یادگیری و به کارگیری علائم بویایی مربوط به حضور مناسب در پیچ‌های مورد بازدید توسط ماده‌ها باعث تغییر مدت زمان ماندن و بهره‌گیری از پیچ می‌شود، که این امر در نهایت منجر به افزایش کارایی موجود زنده در طبیعت می‌شود (Keasar et al. 2001, Outreman et al. 2005). تاکنون

به منظور تهیه، روی درپوش ظروف منفذی به ابعاد ۱۴ × ۷ ایجاد و با توری مسدود شد. پرورش در دمای ۲۵±۱ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰±۱۰ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. حشرات کامل ظاهر شده، جمع‌آوری و درون قیف‌هایی که انتهای آن‌ها با توری مسدود شده بود منتقل شدند تا تخم‌ریزی نمایند. تخم پروانه‌ها هر ۲۴ ساعت یک بار از روی بشقاب‌ها جمع‌آوری شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۹- درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد تا عقیم‌سازی صورت گیرد.

پارازیتوئید

پرورش زنبورهای (Hym.: Trichogrammatidae) *Trichogramma brassicae* آلوده و غیر آلوده به باکتری *Wolbachia* مورد استفاده در این تحقیق در دمای ۲۵±۱ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰±۱۰ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. تعداد ۲۰۰ عدد تخم میزبان با حداکثر طول عمر یک روزه روی کاغذهایی به ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر به کمک آب و عسل چسبانده شد. سپس هر یک از این کارت‌ها در اختیار یک عدد زنبور بالغ یک روزه قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت زنبورها جدا سازی شده و تخم‌ها درون لوله‌های آزمایش به طور جداگانه تا زمان خروج حشرات بالغ نسل جدید در همان شرایط نگهداری شد. به منظور اطمینان از ماده زا بودن زنبورهای موجود، تمامی نتاج زنبورها مورد بازرسی قرار می‌گرفتند تا از ماده بودن تمام نتاج تولیدی زنبورهای مورد آزمایش اطمینان حاصل شود.

ترجیح ذاتی

به منظور بررسی ترجیح ذاتی (Innate preference) زنبورهای مورد آزمایش نسبت به نشانه‌های بویایی به کار رفته در این تحقیق، تعداد ۴۰ زنبور (تکرار) با طول عمر یک روز که هیچ گونه تجربه برخوردی با میزبان نداشتند، انتخاب گردیده و به صورت انفرادی در تونل باد در معرض دو رایحه لیمو و نعناع (۹۷٪ خلوص) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. زنبورهایی که در هر بازوی تونل به مدت ۴۵ ثانیه توقف می‌کردند، این عمل توقف به عنوان پاسخ مثبت این زنبورها نسبت به هریک از آن

زنبورهای آلوده به باکتری *Wolbachia* پرداخته‌اند. گرنیر و دی‌کلارک بیان کردند که زنبورهای آلوده به باکتری *Wolbachia* میزان باروری، زنده‌مانی و درصد پارازیتیسیم کمتر و اندازه کوچک‌تری نسبت به زنبورهای غیر آلوده دارند (Grenier and De Clercq 2003). کمتر بودن میزان باروری، خروج زنبورهای بالغ و میزان تعداد تخم‌های بالغ در تخمدان زنبورهای آلوده به *Wolbachia* توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (Miura and Tagami 2004). از نظر ویژگی‌های رفتاری نیز مطالعات انجام شده بیان‌کننده‌ی نتایج متفاوت و متناقضی هستند. آلمیدا و همکاران مشاهده کردند که زنبورهای آلوده در میزان و سرعت راه رفتن تفاوت معنی‌داری با زنبورهای غیرآلوده ندارند (Almeida et al. 2010). فرخی و همکاران گزارش کردند که زنبورهای آلوده دارای زمان دستیابی بیشتری در مقایسه با زنبورهای غیرآلوده هستند (Farrokhi et al. 2010).

تحقیقات متعددی روی ویژگی‌های زیستی و رفتاری زنبورهای تریکوگراما انجام شده است (Farrokhi et al. 2010, Kuske et al. 2003, Babendreier et al. 2003, Wu et al. 2000, Attaran 2009). اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص توانایی یادگیری و دوام حافظه آن صورت پذیرفته است. در این پژوهش تلاش شده است تا به این پرسش علمی پاسخ داده شود که آیا گونه *T. brassicae* علیرغم جثه‌ی بسیار کوچک خود توانایی بروز رفتارهای پیچیده مانند یادگیری را دارد یا خیر؟ و همچنین آلودگی این پارازیتوئید به باکتری *Wolbachia* چه تاثیری می‌تواند بر این رفتارها داشته باشد. این دانسته‌ها می‌تواند ضمن گسترش دانش بشری، ما را در کاربرد بهتر و بهبود فرایند تولید تجاری این عامل بیولوژیک یاری نماید.

مواد و روش‌ها

میزبان

از بید آرد *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae) به عنوان میزبان زنبور استفاده شد. برای پرورش میزبان ۰/۳ گرم تخم بید آرد به ظروف محتوی یک کیلوگرم آرد سیوس‌دار همراه با مخمر، در داخل ظروف مستطیلی شکل به ابعاد ۱۰×۱۶×۲۳ اضافه شد و

پنج دقیقه پاسخ آن‌ها در تونل باد مشاهده گردید (شکل ۱). تونل باد استفاده شده در این تحقیق بر اساس تونل باد استفاده شده توسط (Yong et al., 2007) برای مطالعه رفتارهای *T. ostriniae* با انجام برخی تغییرات ساخته شد. هوا به داخل محفظه تونل اصلی ($200 \times 50 \times 50$ سانتی‌متر) توسط یک موتور که در قسمت انتهایی آن تعبیه شده بود پمپ و از طرف دیگر تونل خارج می‌شد. بین فن و اتاق اصلی لایه‌های تور تعبیه شده بود تا باعث ایجاد جریان هوای آرام در داخل تونل شود. یک تونل کوچک ($20 \times 20 \times 50$ سانتی‌متر) به عنوان محل رهاسازی و مشاهده پاسخ‌های رفتاری در داخل تونل اصلی قرار داده شد. جنس هردو تونل اصلی و کوچک از پلکی گلس با ضخامت ۱۰ میلی‌متر بود.

برای ثبت پاسخ‌های بویایی زنبورها در تونل باد، برای زنبورهای شرطی‌شده با رایحه‌ی نعناع از رایحه‌ی لیمو و برای زنبورهای شرطی‌شده با لیمو از رایحه‌ی نعناع به عنوان رایحه‌ی جدید استفاده شد.

به این منظور دو رایحه‌ی بویایی نعناع و لیمو با غلظت ۵۰ میکرولیتر/دسی لیتر در داخل تونل باد قرار گرفت. مدت زمان آزمایش ۱۵ دقیقه تعیین و هنگامی که زنبورها در هر بازو به مدت ۴۵ ثانیه توقف می‌کردند، این توقف به عنوان جلب شدن به آن رایحه‌ها ثبت می‌شد. بعد از هر چهار مرتبه رهاسازی زنبور در دستگاه بویایی سنج، برای جلوگیری از اثرات سوگیری (Positional Effect) مکان رایحه‌ها در داخل دستگاه تعویض می‌شد. آزمایش‌ها همگی در شرایط آزمایشگاهی 1 ± 25 درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی 10 ± 50 ٪ صورت گرفت. برای مطالعه‌ی دوام حافظه، ابتدا زنبورها به شیوه‌ی گفته شده در بالا با بوی نعناع شرطی شده، سپس از تانک‌ها خارج و بعد از مدت زمان صفر (۵ دقیقه پس از شرطی‌سازی)، دو، چهار، شش، هشت الی ۲۰ ساعت بعد از شرطی‌سازی پاسخ آن‌ها در تونل باد به شیوه‌ی آزمایش قبلی ثبت شد. بدین ترتیب که زنبورها بعد از خروج از تانک‌ها درون ظرف‌هایی که در آن‌ها آب و عسل به طور جداگانه در اختیارشان قرار می‌گرفت در شرایط آزمایشگاهی دمای 1 ± 25 درجه سلسیوس، رطوبت 10 ± 70 ٪ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در مدت زمان‌های مورد نظر

رایحه‌ها ثبت گردید. در این آزمایش دو رایحه به طور جداگانه در مقایسه با هوا در تونل باد که در یکی از بازوها بوی نعناع و در بازوی دیگر هوا و در آزمایش دیگر در یک بازو بوی لیمو و در بازوی دیگر هوا جریان داشت مورد مطالعه قرار گرفت.

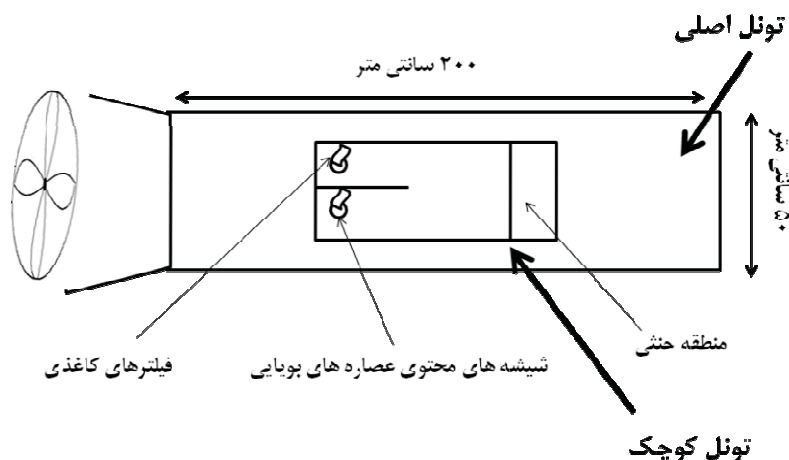
شرطی‌سازی

برای جلوگیری از القاء فرآیندهای خوگرستن (Habituate) و حساس‌شدن (Sensitize) در زنبورهای پارازیتویید مورد مطالعه در طی آزمایش‌های یادگیری، ابتدا مدت زمان لازم برای پارازیتیسیم تعداد ۱۰۰ عدد تخم بید آرد و یا ترک این پچ‌ها توسط زنبورهای با حداکثر طول عمر ۲۴ ساعت ثبت و اندازه‌گیری شد. تخم‌های میزبان توسط محلول آب و عسل ۱۰٪ روی کارت‌هایی به ابعاد 1×5 سانتی‌متر چسبانده شد. تعداد ۴۰ عدد زنبور درون لوله‌های آزمایش (1×10 سانتی‌متر) بصورت جداگانه قرار گرفتند و مدت زمان ترک کارت‌های تخم ثبت گردید. میانگین زمان صرف شده برای ترک کارت‌های تخم توسط ۴۰ عدد زنبور بطور جداگانه محاسبه شد. بر این اساس زنبورها بصورت میانگین در طی مدت زمان سه ساعت پچ را ترک می‌کردند و به همین دلیل مدت زمان قرارگیری زنبورها در تانک‌های شرطی‌سازی سه ساعت تعیین شد.

برای آزمایش‌های فراگیری، تعداد ۵۰ عدد زنبور بالغ با حداکثر طول عمر ۲۴ ساعت که تجربه برخورد با میزبان را نداشتند، انتخاب گردید. تعداد ۱۰۰ عدد تخم یک روزه‌ی بید آرد (میزبان) درون تانک‌های شرطی‌سازی با ابعاد $25 \times 25 \times 25$ سانتی‌متر به مدت سه ساعت در اختیار هر یک از زنبورها قرار گرفت.

دستگاه شرطی‌سازی شامل یک پمپ هوا با ظرفیت هواده‌ی ۷ لیتر در دقیقه، مخزن نگهداری رایحه‌ی بویایی و تانک شرطی‌سازی بود. در طی شرطی‌سازی، رایحه نعناع (درجه خلوص ۹۷٪) با سرعت ۶ متر بر ثانیه به درون تانک‌های شرطی‌سازی پمپ شد. نیمی از زنبورهای مورد آزمایش با رایحه‌ی نعناع و نیمی دیگر با رایحه‌ی لیمو (۹۷٪ خلوص) شرطی‌سازی شدند. تعداد ۴۰ عدد از زنبورهای شرطی‌شده برای بررسی پاسخ‌های رفتاری آن‌ها انتخاب شدند. بعد از گذشت سه ساعت، زنبورها از تانک‌های شرطی‌سازی خارج شدند و پس از

نگهداری شدند و در این مدت زنبورها هیچ‌گونه تماسی با میزبان نداشتند.



شکل ۱. نمای شماتیک تونل باد مورد استفاده در مطالعه یادگیری زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae*

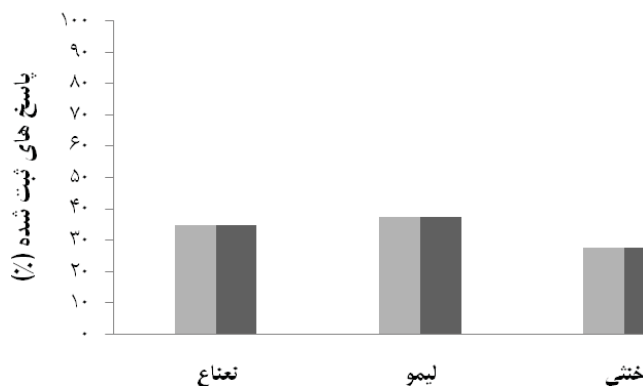
نتایج

براساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که زنبورها نسبت به هیچ یک از رایحه‌های به کار رفته در آزمایش هیچ گونه ترجیح ذاتی نداشتند و میان پاسخ‌های بویایی آن‌ها نسبت به تیمارهای هوا و نعناع ($\chi^2 = 0.168$, $P = 0.683$) و تیمارهای هوا و رایحه‌ی لیمو ($\chi^2 = 0.421$, $P = 0.51$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در هنگام مقایسه‌ی پاسخ ذاتی زنبورها نسبت به بوهای لیمو و نعناع نیز تفاوت معنی‌داری میان میزان جلب‌شدن به هر یک از بوهای مورد آزمایش ثبت نشد ($\chi^2 = 0.334$, $P = 0.8469$).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آنالیز پاسخ‌های ثبت شده از آزمون Chi-Square استفاده شد. هنگامی که تفاوت معنی‌داری در آنالیز نتایج مشاهده شد، توانایی یادگیری اثبات‌شده تلقی گردید.

پاسخ‌های بویایی زنبورها در فواصل زمانی ذکر شده نیز توسط آزمون Chi-Square آنالیز شد و در صورت مشاهده‌ی تفاوت معنی‌دار در نتایج دوام حافظه در زمان‌های ذکر شده اثبات شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS Proc Freq. (Ver. 9.1) در صورت گرفت (SAS Institute, 2003).



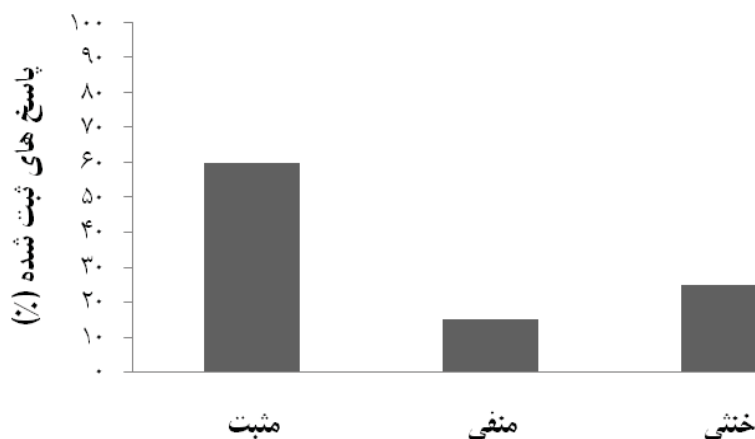
شکل ۲. درصد پاسخ‌های ذاتی زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* نسبت به رایحه‌های بویایی مختلف مورد آزمایش

شرطی سازی و غیر شرطی شده، پس از شرطی‌سازی، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳) که این امر

این در حالی است که میان پاسخ‌های بویایی زنبور *T. brassicae* نسبت به بوهای شرطی شده در خلال

دوام حافظه‌ی زنبورهای شرطی شده با گذشت زمان، نیز ادامه می‌یابد.

نشان‌دهنده‌ی وجود توانایی یادگیری بوهای شرطی شده در زنبور *T. brassicae* می‌باشد ($\chi^2=9.098$, $P=0.0026$). همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که



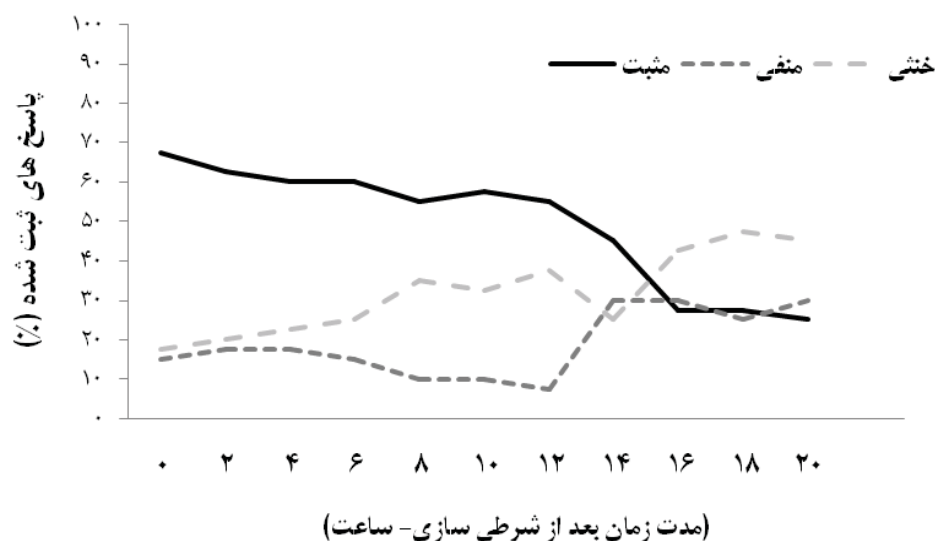
شکل ۳. درصد پاسخ‌های ثبت شده زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* نسبت به رایحه‌های بویایی مختلف مورد آزمایش بلافاصله بعد از شرطی‌سازی

زنبورهای شرطی شده نسبت به رایحه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (جدول ۱). نمودار روند پاسخ‌های ثبت شده در شکل ۴ نشان داده شده است.

حداکثر دوام حافظه در زنبور *T. brassicae* آلوده به باکتری *Wolbachia* در این تحقیق، ۱۲ ساعت ثبت شد ($\chi^2=8.696$, $P=0.0129$) و ۱۲ ساعت پس از شرطی‌سازی تفاوت معنی‌داری میان پاسخ‌های بویایی

جدول ۱. نتایج تفاوت آماری پاسخ‌های ثبت شده زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* در زمان‌های مورد مطالعه نسبت به بوی شرطی شده

P value	χ^2	مدت زمان بعد از شرطی‌سازی (ساعت)
۰/۰۰۲۶	۹/۰۹۸	۰
۰/۰۳۳۹	۶/۷۶۸	۲
۰/۰۱۷۵	۸/۰۹۱	۴
۰/۰۴۴۴	۶/۲۲۹	۶
۰/۰۲۸۷	۷/۱۰۵	۸
۰/۰۲۳۲	۷/۵۳۱	۱۰
۰/۰۱۲۹	۸/۶۹۶	۱۲
۰/۵۴۱۹	۱/۲۲۵	۱۴
۰/۴۳۳۷	۱/۶۷۱	۱۶
۰/۵۴۱۹	۱/۲۲۵	۱۸
۰/۹۱۸۴	۰/۱۷۲	۲۰



شکل ۴. روند پاسخ‌های بویایی ثبت شده زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* در زمان‌های مورد مطالعه نسبت به بوی شرطی شده

فاکتورهای مربوط به فرد مانند سن فیزیولوژیکی، تجربه و فاکتورهای محیطی می‌توانند این پاسخ‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (Geervleit *et al.* 1998). تجربه می‌تواند باعث تغییر در حساسیت گیرنده‌های بویایی در شاخک‌های حشرات شود (Papaj and Lewis 1993, Wajnberg and Colazza 2013). مواجه شدن با نشانه‌ی مرتبط با حضور میزبان و یک نشانه‌ی بدون پاداش بدون ارتباط با حضور میزبان به پارازیتوئید اجازه می‌دهد که میان اهمیت نشانه‌ها، تفاوت قائل شود (Meiners *et al.* 2012, Kruidhof *et al.* 2003). این تفاوت باعث تحریک موجود زنده برای یادگیری و استفاده از آن‌ها برای رسیدن سریع‌تر به میزبان می‌شود و زنبورها بوهای جدید را به حضور میزبان ارتباط می‌دهند (Papaj and Lewis 1993). زنبور پارازیتوئید *Bracon mellitor* (Hym.: Braconidae) نسبت به بوی افزودنی ضد میکروبی Methyl Parahydroxy Benzoate که به رژیم غذایی میزبان اضافه شده بود پاسخ داده و به سمت آن جلب می‌شود؛ بعبارت دیگر *B. mellitor* این نشانه‌ی جدید را فرا گرفته و این نوع یادگیری، از نوع کلاسیک (Associative Learning) است (Papaj and Lewis 1993). در این پژوهش زنبور *T. brassicae* نیز نشان داد که قادر به برقراری ارتباط با حضور میزبان و نشانه‌ی جدید بوده و نسبت به نشانه‌ی جدید مربوط به حضور میزبان پاسخ مثبت نشان می‌دهد. این توانایی، زنبور

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که زنبور *T. brassicae* علیرغم جثه‌ی بسیار کوچک خود توانایی بروز رفتارهای پیچیده‌ای که معمولاً در حیوانات متکامل‌تر مشاهده می‌شود، را دارد. براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که این حشره قادر به یادگیری نشانه‌های بویایی مربوط به حضور میزبان بوده و این نشانه‌های فراگرفته شده را نیز می‌تواند تا مدت زمان ۱۲ ساعت به یاد داشته و در حافظه خود ثبت کند. با احتساب طول عمر نسبتاً کوتاه زنبورهای بالغ در گونه‌ی *T. brassicae* و تنها یک‌بار تجربه برخورد با این نشانه‌ی جدید، این مدت زمان حافظه را می‌توان به عنوان حافظه‌ی طولانی مدت برای این گونه منظور کرد. شناخت هرچه بیشتر میزان و قدرت یادگیری و همچنین دوام حافظه و تجربه‌ی برخورد با میزبان‌های مختلف این حشره علاوه بر کشف ویژه‌گی‌های ذاتی و افزودن بر دانسته‌های بشری در نهایت می‌تواند ما را علاوه در بهبود احتمالی فرایند تولید تجاری این عامل مفید در کارگاه‌های تولیدی یا انسکتاریم‌ها و در کاربرد و بهره‌برداری بهتر آن در مزارع و باغات یاری نماید.

پارازیتوئیدهایی که میزبان را جستجو می‌کنند توسط علائم بینایی و شیمیایی ترشح شده از منابع مختلف به سمت میزبان هدایت می‌شوند، که اغلب این پاسخ‌های رفتاری مخصوص به هر گونه می‌باشد؛ ولی

ثانویه زنبور نیاز به سنتز پروتئین‌های خاصی در طی فرآیند یادگیری و یادآوری نشانه‌ها دارد (Hoedjes *et al.* 2011). مشخص شده است که زنبور *T. brassicae* قادر است نشانه‌های بویایی مربوط به جفت‌گیری میزبان و همین‌طور نشانه‌های بویایی متضاد شده از گیاهان میزبان را بعد از تجربه آن‌ها تا ۲۴ ساعت به خاطر آورد (Huigens *et al.* 2010, Fatouros *et al.* 2005). نوع حافظه نشان داده شده توسط این زنبور از نوع حافظه‌ی کوتاه مدت ثانویه ذکر شده است (Huigens *et al.* 2010, Fatouros *et al.* 2005). براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص شد که زنبور *T. brassicae* آلوده به باکتری *Wolbachia* قادر به یادآوری نشانه‌های فراگرفته شده بعد از یک‌بار تجربه تا مدت زمان ۱۲ ساعت می‌باشد. این تدوام حافظه در مقایسه با طول عمر این زنبورها (بیش از پنج روز در شرایط آزمایشگاهی) کوتاه می‌باشد. به نظر می‌رسد که علت این امر می‌تواند به دلیل اثرات منفی باکتری روی زنبور باشد. چرا که تاکنون اثرات منفی متعددی از این باکتری بر روی کارایی، باروری، طول عمر، قدرت پرواز، میزبان‌یابی و سرعت راه رفتن زنبورهای آلوده به آن نشان داده شده است (Miura and Tagami 2004, Almeida *et al.* 2010, Weeks *et al.* 2007, Fialho and Stevens 2000). باقی ماندن جنس ماده در پیچ میزبان بستگی به عوامل مختلفی دارد و زنبورهای ماده با استفاده از نشانه‌های مختلف محیطی زمان ماندن خود را در پیچ تنظیم می‌کنند (Thiel and Hoffmeister 2004). تجربه‌ی برخورد با پیچ‌های با کیفیت سبب تغییر زمان بهره‌برداری از پیچ می‌شود و زنبورهای ماده تمایل به صرف زمان بیشتر در این پیچ‌ها از خود نشان می‌دهند (Wajnberg *et al.* 1999). نشانه‌های مختلف بویایی و بینایی مرتبط با حضور میزبان‌های با کیفیت و پیچ‌های با کیفیت بالا باعث هدایت ماده‌ها به یافتن پیچ‌های جدید با کیفیت می‌شود. یادگیری نشانه‌های مرتبط با میزبان‌های با کیفیت باعث می‌شود که زنبورها با سرعت بیشتری پیچ‌های جدید را پیدا کنند. هر عملی که باعث شود یک عامل کنترل بیولوژیک به ایده آل‌ترین کارایی ممکن نزدیک شود می‌تواند مفید باشد (van Baaren and boivin 1998).

ماده را قادر می‌سازد تا در طبیعت بعد از برخورد با میزبان، نشانه‌های مربوط به حضور میزبان مانند بوی گیاه میزبان، فرمون‌های جنسی میزبان و نشانه‌های دیگر مربوط به حضور میزبان را در محیط فراگرفته و با توجه به این نشانه‌ها میزبان خود را در مدت زمان کمتر، با سرعت و دقت بیشتر و با صرف انرژی کمتر پیدا کند.

پارازیتوئیدهای عمومی می‌توانند دارای انعطاف‌پذیری بالایی در انتخاب پس زمینه مربوط به حضور میزبان باشند؛ در حالی که امکان است پارازیتوئیدهای اختصاصی‌ها یادگیری را صرفاً برای چرخش موقتی به سمت پس‌زمینه‌هایی با اهمیت کمتر به خدمت بگیرند. پارازیتوئیدهای عمومی در طی یافتن محیط مجبورند با نشانه‌های مختلف بیشتری نسبت به اختصاصی‌ها برخورد کنند و به همین دلیل یادگیری یک استراتژی مفید برای یافتن مناسب‌ترین محیط‌ها می‌باشد (Segura *et al.* 2007). به نظر می‌رسد که ظرفیت یادگیری نشانه‌های مختلف توسط گونه‌های عمومی بیشتر باشد ولی دوام حافظه‌ی این گونه‌ها در مقایسه با گونه‌های اختصاصی کمتر خواهد بود.

زنبور *T. brassicae* نیز گونه‌ای عمومی می‌باشد که در مناطق و روی میزبان‌های مختلف فعالیت می‌کند، این دامنه‌ی میزبانی وسیع سبب شده که این گونه با نشانه‌های مختلف و متفاوتی برخورد داشته باشد که آن را قادر می‌سازد تا نشانه‌های متفاوتی را گرفته و از آن‌ها در جهت میزبان‌یابی استفاده کند.

دوام یادگیری و به یاد آوردن آموخته‌ها در حشرات بسته به گونه‌ی حشره و مرحله‌ی زندگی (قبل و بعد از بلوغ) متفاوت است و می‌تواند از چند دقیقه تا چند روز متغیر باشد.

حافظه بویایی در زنبور *Pholetesor bicolor* (Hym.: Braconidae) تا ۱۴ روز در غیاب تجربه نیز ادامه خواهد داشت (Dutton *et al.* 2000). در زنبورهای پارازیتوئید دو نوع حافظه مشخص شده است: حافظه کوتاه مدت اولیه (early short-term memory, STM)، و حافظه کوتاه مدت ثانویه (Late STM). در حافظه‌ی کوتاه مدت اولیه، زنبور پس از برخورد با یک نشانه‌ی جدید قادر به یادآوری آن نشانه تا مدت زمان بسیار کوتاه خواهد بود در حالی که در حافظه‌ی کوتاه مدت

و هم در فرایند تولید انبوه آن در انسکتاریم‌ها در اقتصادی کردن تولید آن و همچنین باعث کاربرد موثرتر این عامل مفید در سیستم‌های کشاورزی مفید می‌گردد. شناخت بهتر ما از مکانیسم‌های یادگیری برای به حداکثر رساندن قدرت کاوشگری شکارگرها و پارازیتویدها از طریق تاثیر تغییرات رفتاری آنها بر روش‌های میزبان‌یابی می‌تواند ما را در کاربرد هدفمندتر آنها کمک نماید. این روش می‌تواند ما را در هدایت رفتار میزبان‌یابی عامل بیولوژیک در پراکنش فردی در هدف قرار دادن آفت مورد نظر کمک کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات پژوهشی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران و با استفاده از حمایت‌های مالی قطب علمی کنترل بیولوژیک آفات گیاهی و همچنین موسسه پژوهشی کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های دانشگاه تهران انجام شده است. همچنین از آقای دکتر رستم عبدالهی و خانم مهندس یاسمن مقدسی بخاطر مساعدت‌هایشان در آنالیز داده‌ها و نظرات ارزشمندشان سپاسگزاری می‌گردد.

یادگیری می‌تواند کارایی پارازیتوید را با چند تجربه قبل از رهاسازی افزایش دهد که این امر در زمینه‌ی تنظیم جمعیت میزبان‌های پارازیتویدها اهمیت دارد (Hastings and godfray 1999, Meiners *et al* 2003,) (Stireman 2002)، از طرفی یادگیری از ارزش بسیار بالایی برخوردار است و باعث افزایش کارایی فرد شده که این به نوبه خود سبب تطبیق بهتر آن‌ها نسبت به شرایط محیطی می‌شود (van Baaren and Boivin 1998). در حین افزایش انتخابی در پاسخ‌پذیری و القای ترجیح، یادگیری می‌تواند جستجوی تصادفی را تبدیل به جستجوی هدفمند کند (Muller *et al.* 2006,) (Dutton *et al.* 2000) که از نتایج این تحقیق می‌توان در بهره‌مندی بهتر از زنبور *T. brassicae* استفاده کرد. جستجوی هدفمند به پارازیتوید کمک می‌کنند تا میزبان‌های با کیفیت بالاتر با صرف انرژی و زمان کمتری پیدا کرده و مورد بهره‌برداری قرار دهد. بنابراین به نظر می‌رسد یادگیری نشانه‌های مرتبط با حضور میزبان، زنبور *T. brassicae* را نیز قادر می‌سازد تا رفتار کاوشگری خود را هدفمندتر کرده و عملاً با صرف انرژی و زمان کمتر اقدام به میزبان‌یابی نماید؛ که این ویژگی‌ها در نهایت باعث بالا رفتن کارایی این گونه هم در طبیعت

REFERENCES

- Almeida R, van Lenteren JC, Stouthamer R (2010) Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behavior?. Brazilian Journal of Biology 70(2): 435-442.
- Attaran MR (2009) Investigation on flight activity of *Trichogramma brassicae* Bezd.(Hym., Trichogrammatidae) at different generations and temperatures of rearing. Journal of Entomological Research 1(3):229-237 (in Persian).
- Babendreier D, Kuske S, Bigler F (2003) Parasitism of non-target butterflies by *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under field cage and field conditions. Biological Control 26(2): 139-145.
- Begum M, Gurr GM, Wraton DS, Nicol HI (2004). Flower color affects tri-trophic-level biocontrol interaction. Biological Control 30: 584-590.
- Chow A, Mackauer M (1992) The influence of prior ovipositional experience on host selection in four species of aphidiid wasps (Hymenoptera: Aphidiidae). Journal of Insect Behavior 5:99-108.
- Cook JM, Butcher RJD (1999) The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. Research of Population Ecology 41: 15–28.
- Cordaux R, Pichon S, Ben Afia hatira H, Doublet V, Greve P, Marcade I, Braquart-Varnier C, Souty-Grosset C, Charfi-Cheikhrouha F, Bouchon D (2012) Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. Zookeys 176 :123-131.
- Corley C, Villacide JM, van Nouhuys S (2010) Patch Time Allocation by a Parasitoid: The Influence of Con-specifics, Host Abundance and Distance to the Patch. Journal of insect behavior 23(6): 431-440.
- Dutton A, Mattiacci L, Dorn S (2000). Learning used as a strategy for host age location in an endophytic host-parasitoid system. Entomologia Experimentalis et Applicata 94:123-132.
- Farrokhi S, Ashouri A, Shirazi J, Allahyari H, Huigens ME (2010) A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. Journal of Insect Science 10:167.

- Fatouros N E, Huigens ME, Van Loon JJA, Dicke M, Hilker M** (2005) Chemical communication: butterfly anti-aphrodisiac lures parasitic wasps. *Nature* 433: 704.
- Fialho RF, Stevens L** (2000) Male killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proceeding of Royal Society London Biology* 267:1469-1473.
- Geervleit JBF, Vreugdenhil I, Dicke M, Vet ELM** (1998). Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 241-252.
- Godfray HCJ, Waage JK** (1988) Learning in parasitic wasps. *Nature*: 331:211.
- Goodacre SL, Martin OY, George Thomas CF, Hewitt GM** (2006) *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Molecular Ecology* 15:517-527.
- Goubault M, Outreman Y, Poinot D, Cortesero AM** (2005) Patch exploitation strategies of parasitic wasps under intraspecific competition. *Behavioral ecology* 16:693-701.
- Grenier S, De Clercq P** (2003) Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. In: van Lenteren JC (ed) *Quality control and production of biological control agents theory and testing procedures*. CAB Publishing, Wallingford, pp 115–131.
- Guerrieri E, Pennacchio F, Tremblay E** (1997) Effect of adult experience on in-flight orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 10:159-165.
- Hastings A, Godfray HCJ** (1999) Learning, host fidelity, and the stability of host-parasitoid communities. *The American Naturalist* 153(3): 295-301.
- Hoedjes H, Kruidhof M, Huigens ME, Dicke M., Vet LEM, Smid HM** (2011) Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasps: opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceeding Royal Society Biology* 278: 889–897.
- Hoffmann AA, Turelli M** (1997) Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O'Neill, R.V., Hoffmann, A.A., Werren, J.H. (Eds.), *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 42–80.
- Huigens ME, Woelke JB, Pashalidou FG, Bukovinszky T, Smid HM** (2010) Chemical espionage on species-specific butterfly anti-aphrodisiacs by hitchhiking *Trichogramma* wasps. *Behavioral Ecology* 21: 470–478.
- Hurst GD, Johnson AP, Schulenburg JH, Fuyama Y** (2000) Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.
- Jeong G, Suh E** (2008) *Wolbachia*-induced reproductive anomalies and their future applications. *Entomological Research* 38:41-48.
- Kaiser L, Jong RD** (1993) Multi-odour memory influenced by learning order. *Behavioral Process* 30:175-184.
- Keasar T, Ney-Nifle M, Mangel M, Swezey S** (2001) Early oviposition experience affects patch residence time in a foraging parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 123–132.
- Kuske S, Widmera F, Edwards PJ, Turlings TDJ, Babendreier D, Biglera F** (2003) Dispersal and persistence of mass released *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in non-target habitats. *Biological Control* 27(2):181-193.
- Langley SA, Tilmon KJ, Cardinale BJ, Ives AR** (2006) Learning by the parasitoid wasp, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), alters individual fixed preferences for pea aphid color morphs. *Oecologia* 150:172–179.
- Lewis WJ, Tumlinson JH** (1988) Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature* 331:257-259.
- Louapre P, van Baaren J, Pierre JS, van Alphen JJM** (2011) Information gleaned and former patch quality determine foraging behavior of parasitic wasps. *Behavioral Ecology* 22(5):1064- 1069.
- Kruidhof HM, Pashalidou FG, Fatouros NE, Figueroa IA, Smid HM, Huigens ME, Vet LEM** (2012) Reward Value Determines Memory Consolidation in Parasitic Wasps. *PLoS ONE* 7(8): e39615.
- Meiners T, Wackers FL, Lewis WJ** (2003) Associative learning of complex odors in parasitoid host location. *Chemical Senses* 28: 231-263.
- Miura K, Tagami Y** (2004) Comparison of life history characters of sexual and *Wolbachia*-associated asexual *Trichogramma kaykai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annual Entomological Society of America* 97(4): 765-769.
- Muller C, Collatz J, Weiland R, Sateidle JLM** (2006) Associative learning and memory duration in the parasitic wasp *Lariophagus distinguendus*. *Animal Biology* 56(2), 221-232.
- Outreman Y, Le Ralec A, Wajnberg E, Pierre JS** (2005) Effect of within and among patch experiences on the patch leaving decision rules in insect parasitoids. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(2), 208-217.
- Papaj DR, Lewis WJ** (1993). *Insect learning*. Chapman & Hall, New York, pp.53-73

- Papaj DR, Vet LEM** (1990) Odor learning and foraging success in the parasitoid, *Leptopilina heterotoma*. Journal of Chemical Ecology 16:3137-3150.
- SAS Institute** (2003) SAS user's guide: statistics, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.
- Segura DF, Viscarret MM, Carabajal Paladino LZ, Ovruski SM, Cladera JL** (2007) Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. Animal Behavior 74: 131-142.
- Sheehan W, Shelton AM** (1989). The role of experience in plant foraging by the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). Journal of Insect Behavior 2:743-759.
- Sinkins SP** (2004). *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34: 723-729.
- Smid HM, Vet LEM** (2006). Learning in insects: From behavior to brain. Animal Biology 56(2):121-124.
- Stireman JO** (2002) Learning in the generalist Tachinid parasitoid *Exorista mella* Walker (Dip.: Tachinidae). Journal Insect Behavior 15(5): 689-706.
- Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A** (2005) *Wolbachia* Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. Advanced Parasitology 60: 245-284.
- Thiel A, Hoffmeister TS** (2004) Knowing your habitat: linking patch-encounter rate and patch exploitation in parasitoids. Behavioral Ecology 15 (3): 419-425.
- Turlings TCJ, Wackers FL, Vet LEM, Lewis WJ, Tumlinson JH** (1993) Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: Papaj DR, Lewis AC, editors. Insect learning. New York: Chapman and Hall. p. 51-78.
- Van Alphen JJM, Bernstein C, Driessen G** (2003) Information acquisition and time allocation in insect parasitoids. TRENDS in Ecology and Evolution 18 (2): 81-87.
- Van Baaren J, Boivin G** (1998) Learning affects host discrimination behavior in a parasitoid wasp. Behavioral Ecology and Sociobiology 42: 9-16.
- Vet LEM, Wackers FL, Dicke M** (1991) How to hunt for hiding hosts: the reliability- detectability problem in foraging parasitoids. Netherland Journal of Zoology, 41:202-214.
- Wackers FL, Lewis WJ** (1991) Olfactory and visual learning and their interaction in host site location by *Microplitis croceipes*. Biological Control 4:105-112.
- Wajnberg E, Colazza S** (2013) Chemical Ecology of Insect Parasitoids. Wiley-Blackwell publication. 328.
- Wajnberg E, Rosi MC, Colazza S** (1999) Genetic variation in patch time allocation in a parasitic wasp. Journal of Animal Ecology 68:121-133.
- Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT, Hoffmann AA** (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. PLoS Biology 5(5): 997-1005.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME** (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology 6: 741-751.
- Wu ZX, Cohen A C, Nordlund DA** (2000) The feeding behavior of *Trichogramma brassicae*: new evidence for selective ingestion of solid food. Entomologia Experimentalis et Applicata 96: 1-8.
- Yong TH, Pitcher S, Gardner J, Hoffmann MP** (2007) Odor specificity testing in the assessment of efficacy and non target risk for *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Biocontrol science and Technology 17(2): 135-153.