نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۴۵۱-۴۴۲

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 4, Winter 2014, P. 442-451

بررسی اثر زمان نگهداری تخم میزبان و آلودگی به باکتری همزیست *Wolbachia* در ویژگی‌های کیفی زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hym.:Trichogrammatidae)

محمود ناظری[۱]- احمد عاشوری[۲]- مجتبی حسینی[۳*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۷

چکیده

هزینه‌های پرورش حشرات و تأمین مقدار کافی دشمنان طبیعی در زمان مناسب از موانع اصلی گسترش کنترل بیولوژیک به روش اشباعی هستند. ذخیره‌سازی این عوامل، علاوه بر افزایش انعطاف‌پذیری در زمان تولید، و امکان هم‌زمانی دشمنان طبیعی با دوره طغیان آفت می‌توانند در کاهش هزینه‌های تولید انبوه نیز موثر باشد. در مورد پارازیتوئیدها می‌توان بجای خود پارازیتوئید میزبان را ذخیره‌سازی کرد، در این روش به دلیل عدم نیاز به زنده ماندن حشرات میزبان بعد از ذخیره‌سازی، محدوده دمایی و دوره نگهداری میزبان می‌تواند بسیار بیشتر از آن در مورد پارازیتوئیدها و شکارگرها باشد. در این تحقیق اثر زمان نگهداری تخم میزبان *Ephestia kuehniella* در سرما، روی ویژگی‌های کیفی *Trichogramma brassicae* بررسی شد. با توجه به شناسایی سوش ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* از این گونه در ایران و مزایای نسبی سوش تک‌جنسی نسبت به دوجنسی، این تیمارها روی هر دو سوش زنبور تریکوگراما، آلوده به باکتری ولباخیا و غیرآلوده اعمال شد. ویژگی‌های مورد استفاده در کنترل کیفیت شامل نرخ پارازیتیسم، طول دوره رشد و نمو، نرخ ظهور، طول عمر و زادآوری افراد ماده و تعداد افراد بی‌بال بود. نتایج این تحقیق بیانگر اثر منفی زمان نگهداری تخم میزبان روی بعضی ویژگی‌های کیفی زنبور تریکوگراما بود. طول دوره رشد و نمو، نرخ ظهور، زادآوری، طول عمر و بی‌بالی، بطور معنی‌داری تحت تأثیر زمان نگهداری تخم میزبان بودند. اما به دلیل تاثیر متفاوت زمان نگهداری تخم میزبان روی دو سوش مورد بررسی به نظر می‌رسد بتوان با انتخاب سوش مناسب اثرات منفی نگهداری تخم‌های میزبان در سرما را کاهش داد.

واژه های کلیدی: بیدآرد، ذخیره‌سازی در سرما، کنترل کیفیت، ماده‌زایی، ولباخیا

مقدمه

یکی از مشکلات اصلی در کنترل بیولوژیک اشباعی، مربوط به پرورش حشرات و هزینه‌های پرورش و همچنین تأمین مقدار کافی حشره در زمان مناسب است (۶). بر خلاف آفت‌کش‌ها، عوامل مورد استفاده در کنترل بیولوژیک زمان انبارداری کوتاهی دارند، به همین دلیل باید در زمان کوتاهی قبل از رهاسازی تولید شوند. گسترش روش‌های ذخیره‌سازی این عوامل، علاوه بر افزایش انعطاف‌پذیری در زمان تولید، و امکان هم‌زمانی دشمنان طبیعی با دوره طغیان آفت می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید انبوه نیز موثر باشد (۳۰). یکی از روش‌های ذخیره‌سازی کاهش نرخ متابولیسم و رشد حشرات از طریق نگهداری آن‌ها در دماهای نزدیک صفر است. با این وجود کاهش شدید در توانایی بعضی حشرات با نگهداری در این شرایط دیده شده (۹)، و حتی در مورد گونه‌های بسیار نزدیک تفاوت‌های زیادی در تحمل حشرات به ذخیره‌سازی در سرما وجود دارد (۱۹). یک روش دیگر که تنها برای پارازیتوئیدها مناسب است، ذخیره‌سازی میزبان دشمن طبیعی به جای خود عامل کنترل بیولوژیک در سرما است. در این روش به دلیل عدم نیاز به زنده ماندن حشرات میزبان بعد از ذخیره‌سازی، محدوده دمایی و دوره نگهداری میزبان می‌تواند بسیار بیشتر از آن در مورد پارازیتوئیدها و شکارگرها باشد. این روش یعنی ذخیره‌سازی میزبان به عنوان یک روش مناسب برای پرورش زنبورهای تریکوگراما پیشنهاد شده است و گونه‌های *T. chilonis* (۱۹) و *T. evanescens* (۲۸) به‌طور موفقیت‌آمیزی روی میزبان‌های نگهداری شده در سرما پرورش داده شده‌اند. گونه‌های مختلف جنس تریکوگراما پر کاربردترین دشمنان طبیعی در جهان هستند و به تخم بسیاری از آفات مهم حمله می‌کنند (۱۷). این زنبورها هاپلودیپلوئید بوده و نتاج ماده از تخم‌های تلقیح شده و نتاج نر

۱ و ۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: m.hosseini@um.ac.ir)

از تخم‌های تلقیح نشده به وجود می‌آیند (Arrhenotoky). با این وجود سوش‌های خاصی از تریکوگراما دارای ماده‌های بکرزا هستند که از تخم‌های تلقیح نشده افراد ماده به وجود می‌آید. در بیشتر موارد بکرزایی تریکوگراما در اثر آلودگی به باکتری Wolbachia است (۲۶). باکتری‌های جنس *Wolbachia* متعلق به خانواده Rickettsiaceae از زیر ردهٔ Alpha-Proteobacteria هستند (۳۲) و عامل القای بکرزایی در حداقل ۱۶ گونه از ۱۹۰ گونه شناخته شده تریکوگراما می‌باشد (۴، ۲۰ و ۲۱). در ایران تا کنون ۱۱ گونه از جنس تریکوگراما گزارش شده (۱) که گونه *Trichogramma brassicae* دارای بیشترین پراکنش در نقاط مختلف کشور می‌باشد (۱). وجود ماده‌زایی تحت تأثیر باکتری *Wolbachia* در این گونه از ایران گزارش شده است (۳). از نظر کاربردی افراد ماده عامل اصلی در کنترل بیولوژیک به وسیله پارازیتوئیدها هستند و یک مکانیسم تأمین پیوسته افراد ماده، مانند ماده‌زایی تحت تأثیر ولباخیا بسیار مورد پسند متخصصان کنترل آفات است، اما نکته‌ای که در مورد استفاده از سوش‌های ماده‌زا تریکوگراما باید مد نظر داشت شایستگی (Fitness) پارازیتوئیدهای آلوده به ولباخیا در برابر پارازیتوئیدهای غیرآلوده است (۲۳).

موفقیت این عوامل کنترل بیولوژیک در مزرعه تنها وابسته به زمان و تعداد دشمن طبیعی رهاسازی شده نمی‌باشد بلکه به کیفیت عامل کنترل بیولوژیک تولید شده نیز ارتباط اساسی دارد (۲۷). روش‌های تولید انبوه پارازیتوییدها و شکارگرها اغلب به صورت آزمون و خطا ایجاد گردیده که ممکن است منجر به تولید دشمنان طبیعی با کیفیت نامطمئن شود (۲۹). در این تحقیق هدف، بررسی اثر زمان نگهداری تخم میزبان در سرما، روی ویژگی‌های کیفی زنبور *T. brassicae* بود و با توجه به شناسایی جمعیت ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* (۴ و ۱۵) و مزیت‌های نسبی سوش‌های ماده‌زا، این بررسی روی دو سوش تک‌جنسی (آلوده به باکتری ولباخیا) و دوجنسی این زنبور پارازیتوئید انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

در این آزمایش از بیدآرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) به عنوان میزبان آزمایشگاهی *T. brassicae* استفاده شد. برای پرورش بیدآرد از جمعیت آزمایشگاهی بیدآرد موجود در آزمایشگاه اکولوژی و رفتارشناسی گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران استفاده گردید که برای ایجاد این کلنی حشرات بیدآرد از موسسه تحقیقات صنعتی شهریار تهیه شده بود. بیدآرد روی رژیم غذایی آرد گندم (۷۵ درصد آرد گندم و ۲۵ درصد سبوس گندم) در شرایط دمایی ۱± ۲۵ °c، رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و نسبت روشنایی ۸:۱۶ : تاریکی پرورش داده شد. بستر پرورش شامل ظروف پلاستیکی مستطیلی شکل به ابعاد ۱۰×۱۵×۲۵ سانتی‌متر حاوی آرد و سبوس گندم به ارتفاع ۴ سانتی‌متر بود. مقدار ۰/۲ گرم تخم بید آرد به بستر ماده غذایی موجود در هر ظرف اضافه شد. در این آزمایش از دو سوش *T. brassicae* آلوده به باکتری ولباخیا و غیرآلوده استفاده شد. زنبورهای *T. brassicae* از کلنی پرورشی موجود در موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران در تهران تهیه شد. این زنبورها روی بید غلات *Sitotroga cerealella* پرورش داده می‌شدند. در زمان تحویل نمونه‌ها این زنبورها شش نسل روی میزبان واسط پرورش داده شده بودند. این زنبورها توسط کارشناسان موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی از استان مازندران، شهرستان بابلسر و از روی تخم‌های پارازیته شده بال‌پولکداران جمع‌آوری شده بود. پس از جمع‌آوری این تخم‌های پارازیته شده، توسط محققان موسسه از هر فرد ماده یک Isofemale ایجاد شد. از نتاج حاصل از این Isofemaleها در این مطالعات استفاده گردید. شناسایی گونه و تائید آلودگی حشرات به باکتری ولباخیا توسط متخصصان موسسه انجام شده بود. در زمان شروع آزمایش زنبورهای تریکوگراما ۱۲ نسل روی میزبان واسط پرورش داده شده بودند که شش نسل اخیر در آزمایشگاه اکولوژی و رفتار شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و آزمایشگاه مدیریت و اکولوژی حشرات دانشگاه فردوسی مشهد روی بیدآرد *E. kuehniella* پرورش داده شد.

تیمار ذخیره‌سازی تخم‌های میزبان

با شروع تخم‌ریزی حشرات کامل بیدآرد تخم‌ها به صورت روزانه جمع‌آوری شدند. تخم‌های گذاشته شده توسط بیدآرد مربوط به روزهای ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ در شش گروه (تیمار) تهیه شد. هر واحد آزمایشی حاوی ۱۹۰ تا۲۱۰ عدد تخم بیدآرد بود که با آب عسل ۱۰٪ روی کارت‌های کاغذی به ابعاد ۱×۶ سانتی‌متر چسبانده شدند. نمونه‌ها به محض جمع‌آوری در همان روز توسط پرتو فرابنفش عقیم می‌شدند؛ و تا زمان پارازیته شدن به صورت مجزا در دمای ۴ °c نگهداری شدند. برای عقیم کردن تخم‌ها از اشعه UV-c (لامپ Philips holland 15w) استفاده شد. تخم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله ۳۰ سانتیمتری تابش پرتو فرابنفش قرار گرفتند. تخم‌های بیدآرد مربوط به تیمارهای مختلف (زمان‌های مختلف نگهداری تخم‌های میزبان) داخل لوله‌های آزمایش شیشه‌ای (۱۰×۱۶۰ میلی‌متر) در شرایط استاندارد (دما ۱°C±۲۵، رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و نسبت روشنایی:تاریکی۱۶: ۸) در معرض پارازیتوئیدهای ماده قرار داده شدند. دهانه لوله آزمایش توسط پنبه مسدود شد، یک نوار باریک از آب عسل ۱۰ درصد نیز روی جدار داخلی لوله آزمایش برای تغذیه زنبورهای بالغ در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت زنبورها از

کارت‌های حاوی تخم دور شدند و تخم‌های پارازیته شده بید آرد تا زمان رسیدن زنبورها به مرحله بلوغ در همان شرایط درون ژرمیناتور نگهداری شدند.

ویژگی‌های مورد استفاده در کنترل کیفیت

نرخ پارازیتیسم

این صفت به منظور تعیین میزان تخم‌گذاری زنبورهای ماده، روی تخم میزبان مورد بررسی قرار گرفت. منظور از نرخ پارازیتیسم، میزان تخم‌های پارازیته شده از تیمارهای مختلف (زمان نگهداری تخم در سرما) در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گیری در معرض یک پارازیتوئید ماده است. تخم‌های پارازیته شده پس از گذشت پنج روز، سیاه شده و به راحتی قابل شمارش می‌باشند.

طول دوره رشد و نمو

فاصله زمانی اولین روزی که تخم‌های میزبان در اختیار زنبور ماده برای پارازیته شدن قرار گرفت تا زمان خروج حشرات بالغ از تخم‌های پارازیته شده، به عنوان طول دوره رشد و نمو در نظر گرفته شد. این دوره بیانگر دوره پیش از بلوغ زنبورها شامل مراحل رشدی جنین، لارو، پیش شفیره و شفیره است.

نرخ ظهور

نرخ ظهور (خروج) حشرات بالغ پارازیتوئیدها از تقسیم تعداد تخم‌های دارای حفره بر تعداد تخم‌های پارازیته شده محاسبه شد. این حفره توسط افراد بالغ هنگام خروج از تخم میزبان ایجاد می‌شود.

طول عمر و زادآوری افراد ماده بالغ

ارزیابی زادآوری و طول عمر ماده‌ها به صورت هم‌زمان انجام شد، به این صورت که بعد از ظهور حشرات بالغ، زنبورهای ماده یک روزه آلوده و غیرآلوده (جفت‌گیری کرده) به ولباخیا به لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰۰ تخم تازه (<۲۴) و عقیم شده بیدآرد منتقل شدند. تا زمان مرگ زنبورها، تخم‌ها هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. تخم‌های خارج شده از لوله‌ها در شرایط استاندارد نگهداری و تخم‌های پارازیته شده شمارش شدند. مجموع تعداد تخم‌های پارازیته شده توسط هر فرد ماده در طول عمر به عنوان زادآوری در نظر گرفته شد. در طی بررسی زادآوری مرگ و میر افراد به صورت روزانه ثبت می‌شد. فاصله زمانی ظهور زنبور ماده تا هنگام مرگ آن، به عنوان طول عمر زنبور در نظر گرفته شد.

تعداد افراد بی‌بال

در تمام تیمارها و تکرارها، زنبورها از نظر وضعیت بال مورد بررسی قرار گرفت و پس از مشاهده تعداد افراد بی‌بال یا با بال بدشکل تعداد آن‌ها تعیین شد. تعداد افراد بی‌بال هر لوله آزمایش به طور جداگانه محاسبه شد. برای کمتر شدن تحرک زنبورها داخل لوله آزمایش آن‌ها را به مدت یک ساعت در سرما گذاشته و یا پس از مرگ، داخل الکل ۷۵٪ قرار گرفته و سپس زیر لوپ تعداد افراد بی-بال، تعیین و ثبت شد.

ارزیابی اثر زمان نگهداری تخم میزبان در نسل نتاج

تاثیر زمان نگهداری تخم میزبان در سرما روی شاخص‌های کیفی نتاج حاصل از نسل مادری نیز با اندازه‌گیری، نرخ پارازیتیسم، طول دوره رشد و نمو، نرخ ظهور حشرات بالغ، طول عمر و زاداوری ماده ها و تعداد افراد بی‌بال، ارزیابی شد. کلیه آزمایشات کنترل کیفیت در نسل مادری و نتاج در شرایط استاندارد (دمای ۱± ۲۵ °c، رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و نسبت روشنایی : تاریکی (۸:۱۶)) انجام گردید.

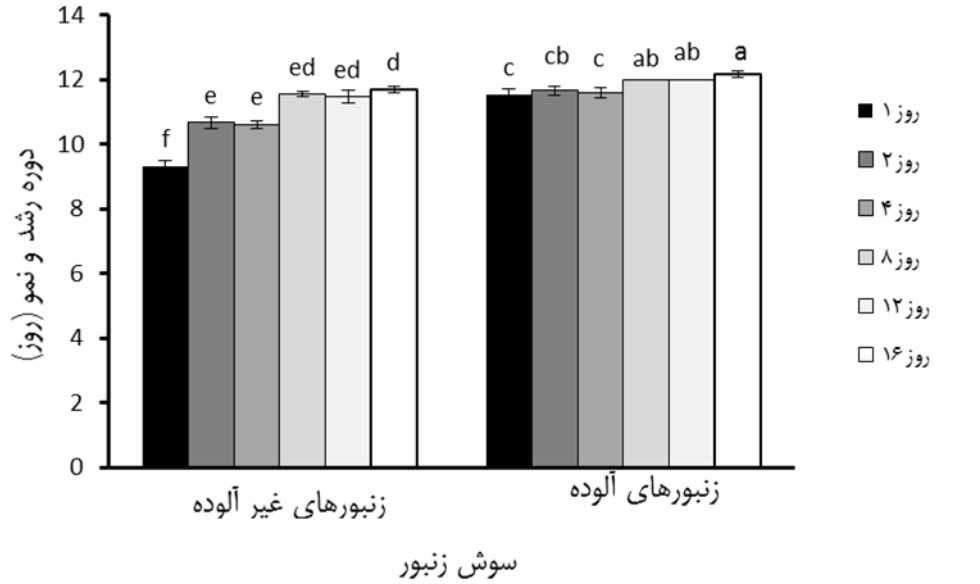
تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل برای تعیین اثر زمان نگهداری تخم میزبان و سوش زنبور پارازیتویید بر شاخص‌های کیفی زنبور *T. brassicae* مورد آزمون تجزیه واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) قرار گرفتند. در صورت معنی‌دار بودن اثرات، گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین توکی انجام شد ($P <$ ۰/۰۵). بعلاوه در صورت معنی‌دار نبودن اثرات متقابل، از رگرسیون ساده خطی برای تعیین اثر زمان نگهداری تخم میزبان در ویژگی‌های کیفی زنبورهای پارازیتویید استفاده شد (SAS ۹/۱ ۲۰۰۲).

نتایج و بحث

نرخ پارازیتیسم

اثر متقابل زمان نگهداری تخم میزبان و سوش تریکوگراما در نرخ پارازیتیسم نسل مادری (F=۱/۷۸; $d.f.$= ۵، ۱۳۲; P=۰/۱۲) و نتاج معنی‌دار نشد (F=۰/۷۳; $d.f.$=۵ ، ۱۲۳ ; P=۰/۶). اثر زمان نگهداری تخم میزبان روی پارازیتیسم تریکوگراما معنی‌دار نبود (F=۱/۷۱; $d.f.$= ۵ ، ۱۳۲; P=۰/۱۳). اثر زمان نگهداری تخم میزبان روی نرخ پارازیتیسم نتاج نیز به تنهایی معنی‌دار نشد (F= ۱/۱۳; $d.f.$= ۵ ، ۱۲۳; P=۰/۳۵). در این بررسی زنبور *T. brassicae* قادر به پارازیته کردن و رشد در تخم‌های میزبان با زمان نگهداری متفاوت بود و به نظر نمی‌رسید که زمان نگهداری تخم میزبان تاثیری در نرخ پارازیتیسم داشته باشد.



شکل ۱- طول دوره رشد و نمو زنبورهای نسل مادری در دو سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده *Trichogramma brassicae* در شرایط آزمایشگاهی.
حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال% ۵ بر اساس آزمون توکی می‌باشند.

بطور مشابه تخم‌های عقیم شده *S. cerealella* که در سرما (تا ۵۰ روز) نگه داری شدند توسط زنبور *T. chilonis* پارازیته می‌شد (۱۹). در نسل مادری و نتاج تفاوت معنی‌داری در نرخ پارازیتیسم بین دو سوش مشاهده نشد (به ترتیب P = ۰/۱۶، ۱۳۲; F=۱/۹۳ ;d.f.=۱ و P=۰/۱۴ ،۱۲۳; F=۲/۱۷; d.f.=۱). فرخی و همکاران (۸)، نیز نشان دادند که زنبورهای دو سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده *T. brassicae* از نظر قدرت جستجوگری مشابه هستند، همچنین پارازیتیسم سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده *T. atopovirilia* روی تخم‌های *E. kuehniella* تفاوت معنی‌داری نداشت (۷).

طول دوره رشد و نمو

اثر متقابل زمان نگهداری تخم و سوش تریکوگراما در طول دوره رشد و نمو زنبورهای نسل مادری معنی‌دار بود (P <۰/۰۱ ;۱۳۲ ،۵ ; F=۱۲/۷۳d.f.=). به طور کلی طول دوره رشد و نمو زنبورهای غیرآلوده پرورش یافته روی تخم‌های میزبان با زمان نگهداری ۱، ۲ و ۴ روز به طور معنی‌داری کوتاه‌تر از دوره رشد و نمو زنبورهای آلوده به ولباخیا و غیرآلوده پرورش یافته روی گروه‌های دیگر تخم میزبان بود (شکل ۱). بر خلاف نسل مادری، اثر متقابل زمان نگهداری تخم و سوش تریکوگراما در طول دوره رشد و نمو زنبورهای نتاج معنی‌دار نبود (P=۰/۳۳ ;۱۲۳ ،۵ =d.f. ;F=۱/۱۷)، اما افزایش زمان نگهداری تخم میزبان باعث افزایش معنی‌دار دوره رشد و نمو زنبورهای پارازیتویید در نتاج شد و کوتاه‌ترین زمان رشد و نمو مربوط به زنبورهای پرورش یافته روی تخم‌های با زمان نگهداری ۱ (۱۱/۲۹±۰/۱۵) و ۲ (۱۱/۳۳±۰/۱۸) روز بود (Y=۱۰/۷۹ +۰/۰۶۱X، R^2=۰/۳۳)، علاوه بر این دوره رشد و نمو زنبورهای نسل نتاج در سوش آلوده به ولباخیا (۱۱/۹۷±۰/۰۹) به طور معنی‌داری بیشتر از سوش غیرآلوده (۱۱/۰۲±۰/۰۲) مشاهده شد (P<۰/۰۱ ;۱۲۳ ،۱ =d.f.;F=۱۰۴/۱۴).

در این تحقیق سرعت رشد و نمو قبل از بلوغ زنبور تریکوگراما در تخم‌هایی که زمان بیشتری در سرما نگهداری شده بودند کمتر بود، که منجر به افزایش طول دوره رشد و نمو زنبورهای پارازیتوئید شد. ممکن است علت، کیفیت متفاوت مواد غذایی تخم‌های با زمان نگهداری متفاوت باشد که اثر خود را بصورت تاخیر در رشد و نمو پیش از بلوغ پارازیتوئیدها نمایان کرده است. در مورد مقایسه بین دو سوش نتایج مشابه، توسط محققان مختلف در مورد گونه *T. kaykai* مشاهده شده است (۱۰، ۱۱ و ۱۸) که همگی به اثر منفی ولباخیا روی زمان رشد و نمو زنبور تریکوگراما تاکید دارند. به این ترتیب حشرات آلوده به ولباخیا و حشراتی که روی میزبان‌های با زمان نگهداری بیشتری پرورش یافته‌اند، در یک دوره زمانی معین تعداد نسل کمتری خواهند داشت، که این امر ممکن است باعث افزایش هزینه‌های تولید انبوه شود.

نرخ ظهور حشرات کامل

اثر متقابل زمان نگهداری تخم میزبان و سوش تریکوگراما در نرخ ظهور نسل مادری (P=۰/۱۱ ; ۱۲۹ ،۵ =d.f. ;F=۱/۸۳) و نتاج

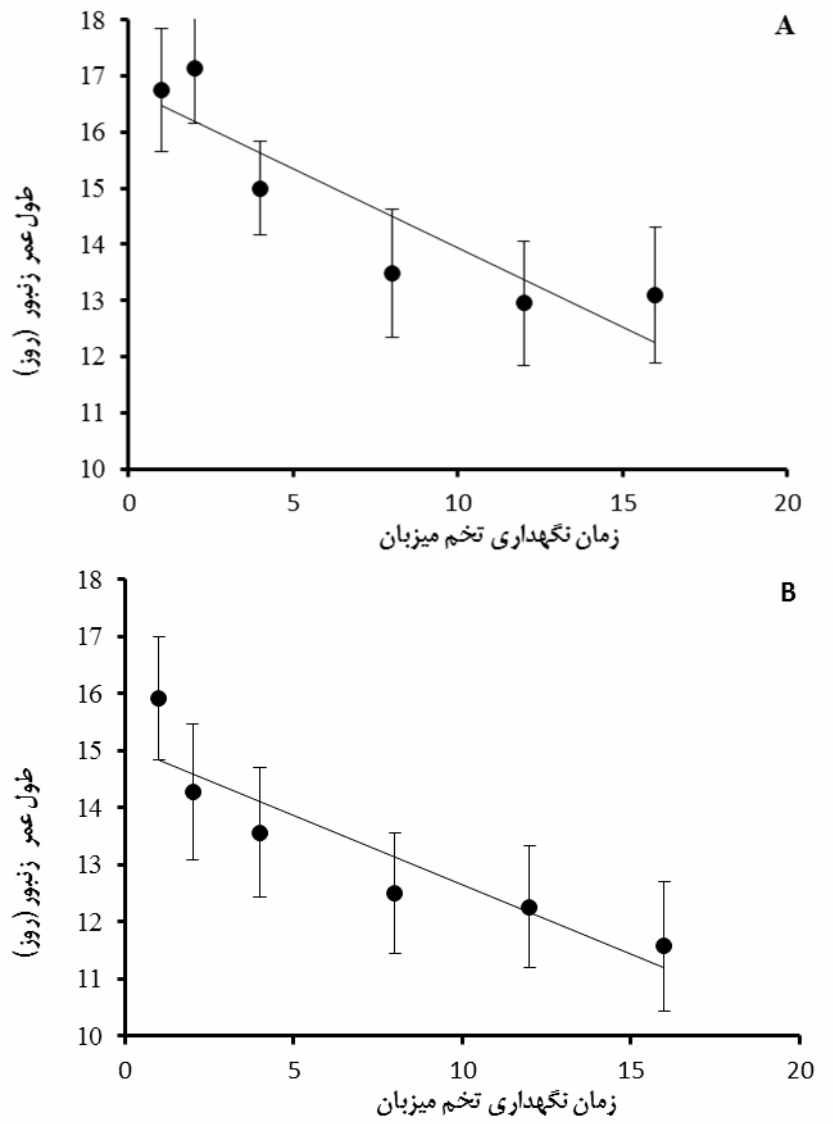
(F=۰/۴۵; d.f.=۵، ۱۱۹ ; P=۰/۸۱) معنی‌دار نشد. اثر زمان نگهداری تخم میزبان در نرخ ظهور زنبورهای نسل مادری معنی‌دار بود (F=۳/۴۶; d.f.=۵، ۱۲۹ ; P<۰/۰۱) و با افزایش زمان نگهداری تخم میزبان نرخ ظهور کاهش یافت (Y=۰/۹۶ −۰/۰۰۳X، R^2=۰/۳۸). اثر زمان نگهداری تخم میزبان در نرخ ظهور نتاج معنی‌دار نبود (F=۱/۶۰; d.f.=۵، ۱۱۹ ; P=۰/۱۷)، اما نرخ ظهور زنبورهای پارازیتویید روی تخم‌های میزبان با زمان نگهداری ۱ (۰/۹۵۶±۰/۰۱۲) و ۲ (۰/۹۵۳±۰/۰۱۲) روز بیشتر بود. با افزایش زمان نگهداری تخم میزبان تعدادی از تخم‌های پارازیته شده در نسل مادری قبل از بلوغ از بین رفتند و نتوانستند رشد خود را در میزبان‌های با زمان نگهداری بیشتر کامل کنند. بر خلاف نتایج مشاهده شده، تانک‌بلیک و همکاران (۲۸) با بررسی اثر سه ماه نگهداری تخم‌های عقیم شده *E. kuehniella* و *S. cerealella*. روی کیفیت *T. evanescens*، تفاوت معنی‌داری در درصد خروج افراد نر و ماده بین تخم‌های عقیم شده توسط پرتو گاما و تخم‌های عقیم نشده که تا ۳۰ و ۶۰ روز نگهداری شده بودند مشاهده نکردند. تفاوت معنی‌داری در نرخ ظهور بین دو سوش در نسل مادری مشاهده نشد (F=۱/۴۴ ; d.f.=۱، ۱۲۹; P=۰/۲۳). اما نرخ ظهور در نتاج زنبورهای غیرآلوده (۰/۹۵±۰/۰۱) به طور معنی‌داری بیشتر از زنبورهای آلوده به ولباخیا (۰/۹۰±۰/۰۱) بود (F=۱۶/۸; d.f.=۱، ۱۱۹ ; P<۰/۰۱). در زنبورهای *T. kaykai* و *T. deion* نیز نرخ ظهور سوش آلوده به ولباخیا بیشتر از سوش غیرآلوده مشاهده شده (۲۷ و ۱۸) که دلیل این امر میزان بیشتر مرگ و میر قبل از بلوغ پارازیتوئید بیان شده بود. نتایج تحقیق حاضر با کارهای قبلی در نسل مادری تفاوت داشت، یک علت احتمالی ممکن است منشاء سوش حشرات غیرآلوده باشد. در این تحقیق سوش غیرآلوده بومی ایران بوده و از طبیعت جمع‌آوری شده و ذاتاً دوجنسی بود، اما در کارهای محققان قبلی سوش دوجنسی، از تیمار سوش تک‌جنسی آلوده به ولباخیا توسط آنتی‌بیوتیک ایجاد شده است. این احتمال وجود دارد که آنتی‌بیوتیک روی مراحل جنینی و لاروی زنبور تریکوگراما تأثیر منفی داشته و باعث اختلاف در درصد خروج حشرات بالغ شده باشد.

طول عمر

اثر متقابل زمان نگهداری تخم و سوش تریکوگراما روی طول عمر زنبورهای بالغ در نسل مادری (F=۱/۰۲ ; d.f.=۵، ۱۲۴; P=۰/۶) و نتاج (F=۰/۱۵; d.f.=۵، ۱۲۴; P= ۰/۹۷) معنی‌دار نشد. اما اثر زمان نگهداری تخم میزبان به تنهایی در طول عمر زنبورهای نسل مادری (Y=۱۶/۷۵ −۰/۲۸X ، R^2=۰/۲۸) و نتاج (Y=۱۵/۱۲ −۰/۲۴X، R^2=۰/۳۶) معنی‌دار بود و زنبورهای خارج شده از تخم میزبان‌های با زمان نگهداری کمتر (۱ و ۲ روز) به طور معنی‌داری طول عمر بیشتری داشتند (شکل ۲ A، B). به نظر می‌رسد زمان نگهداری تخم میزبان در زمان پارازیته شدن نه تنها در افزایش طول عمر زنبورهای بالغ نسل مادری اثر گذار است بلکه در افزایش طول عمر زنبورهای نسل بعد نیز موثر می‌باشد. احتمالاً تخم‌های با زمان نگهداری کمتر مواد غذایی با کیفیت‌تری دارند که با افزایش طول عمر حشرات بالغ اثر خود را نشان می‌دهند. این نتایج با یافته‌های ندیم (۱۹) هم راستا است که گزارش داد طول عمر *T. cacoeciae* خارج شده از تخم‌های نگهداری شده در سرما با افزایش زمان نگهداری کمتر می‌شد. طول عمر در سوش آلوده به ولباخیا در نسل مادری (۱۵/۸۹ ±۰/۵۷) و نتاج (۱۵/۱۸±۰/۶۶) به طور معنی‌داری بیشتر از سوش غیرآلوده در نسل مادری (۱۳/۶۲±۰/۶۷) و نتاج (۱۱/۶۸±۰/۵۷) بود (به ترتیب F=۷/۰۸; d.f.=۱، ۱۲۴; P<۰/۰۱ و F=۱۶/۲۳; d.f.=۱،۱۲۳ ; P<۰/۰۱). نتایج مطالعات محققان دیگر (۱۱ و ۱۸) نیز نشان داد که زنبورهای گونه *T. kaykai* آلوده به ولباخیا طول عمر بیشتری نسبت به زنبورهای غیرآلوده داشتند. که بیانگر اثر ولباخیا روی طول عمر زنبورها است که ممکن است یک سازش برای افزایش انتقال باکتری باشد. در مطالعه سیلوا و همکاران (۲۴) نیز با از بین بردن باکتری ولباخیا توسط آنتی بیوتیک کاهش طول عمر آن‌ها مشاهده شد که می‌تواند تائید کننده اثر ولباخیا در افزایش طول عمر زنبوها باشد. با این وجود بعضی محققان (۱۲ و ۲۵) در بررسی‌های خود طول عمر مشابهی را برای سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده مشاهده کردند.

زادآوری

اثر متقابل زمان نگهداری تخم و سوش تریکوگراما روی زادآوری تریکوگراما در نسل مادری معنی‌دار شد (F=۸/۲۹ ; d.f.=۵، ۱۳۱; P=۰/۰۱). زنبورهای ماده غیرآلوده پرورش یافته روی تخم‌های میزبان با زمان نگهداری کمتر (۲،۱ و ۴ روز) به طور معنی‌داری نسبت به زنبورهای پرورش یافته روی گروه‌های دیگر تخم میزبان از زاد-آوری بالاتری برخوردار بودند (شکل ۳). اثر متقابل زمان نگهداری تخم میزبان و سوش تریکوگراما روی زادآوری زنبورهای پارازیتویید در نتاج معنی‌دار نبود (F=۱/۲۳; d.f.=۵، ۱۲۵; P=۰/۳). اما اثر زمان نگهداری تخم میزبان روی زادآوری زنبورها معنی‌دار بود و یک رابطه غیر مستقیم بین زادآوری و زمان نگهداری تخم میزبان وجود داشت (Y=۱۱۹/۷۵ −۱/۵۶X، R^2=۰/۲۶) و بیشترین میزان زادآوری روی تخم‌های با زمان نگهداری ۱ (۱۲۳/۳۳±۶/۲۴) و ۲ (۱۱۶/۹۰±۷/۲۹) روز مشاهده گردید. به علاوه، زادآوری زنبورهای نتاج در سوش غیرآلوده به ولباخیا (۱۱۸/۷۶±۳/۶۱) به طور معنی‌داری بیشتر از زادآوری زنبورها در سوش آلوده (۹۸/۳۵±۳/۷۴) مشاهده شد (F=۱۷/۰۲; d.f.=۱، ۱۲۵; P=۰/۰۱).

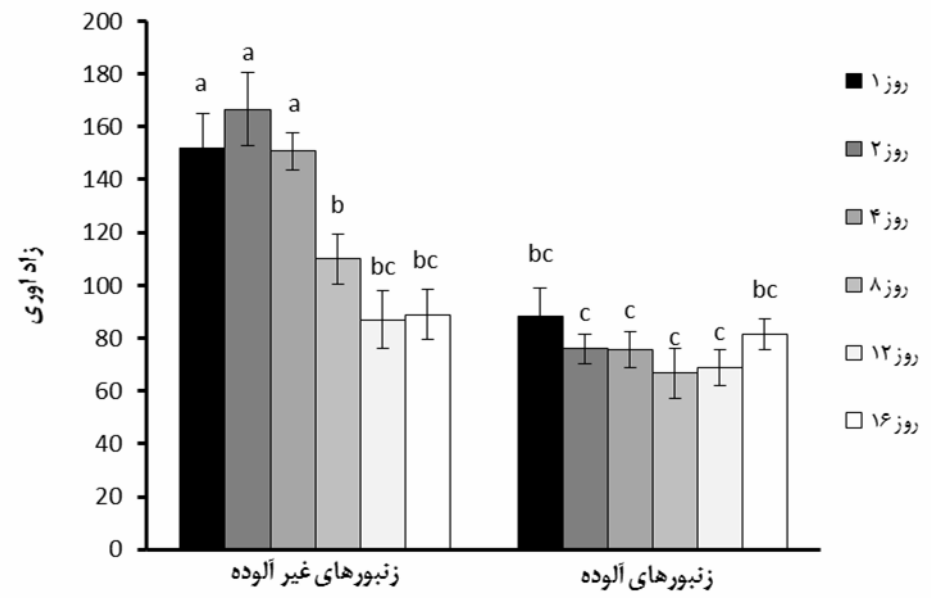


شکل ۲- (A) رابطه طول عمر زنبورهای *Trichogramma brassicae* در نسل مادری (R^2=۰/۲۸ ، Y=۱۶/۷۵ -۰/۲۸X) و (B) نتاج (R^2=۰/۳۶ ، Y=۱۵/۱۲ -۰/۲٤X) با زمان نگهداری تخم بید آرد *Ephestia Kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyradidae) در سرما، تحت شرایط آزمایشگاهی

در مقایسه دو سوش در تحقیق حاضر حشرات غیرآلوده *T. brassicae* زادآوری بیشتری نسبت به سوش آلوده به ولباخیا داشتند. گزارش‌های بسیاری نیز به زادآوری پایین‌تر زنبور تریکوگرامای آلوده به ولباخیا نسبت به غیرآلوده اشاره دارد (۱۰، ۲۴ و ۳۱) که بیانگر اثر منفی ولباخیا روی زادآوری تریکوگراما است. با این وجود گزارشاتی نیز مبنی بر بی‌اثر بودن ولباخیا روی زادآوری ماده‌ها وجود دارد (۷ و ۱۳).

درصد بی بالی

حشرات بالغ تریکوگراما ممکن است به دلیل شرایط نامناسب پرورش یا حمل و نقل دچار بی‌بالی یا بدشکلی بال‌ها شوند. زنبورهای کوتاه‌بال یا بی‌بال، طول عمر و قدرت جستجوگری پایین‌تری داشته و میزان کارایی آن‌ها نسبت به پارازیتوئیدهای معمولی کمتر می‌باشد (۲). تحقیقات قبلی نیز بیانگر این است که اندازه و شکل بال معیارهای مناسبی برای پیش‌بینی کارایی زنبور تریکوگراما است و آن‌هایی که در مزرعه کارایی خوبی داشتند از بال‌های بزرگ‌تری برخوردار بودند (۱۶). در این بررسی اثر متقابل زمان نگهداری تخم و سوش تریکوگراما روی درصد بی‌بالی زنبورها در نسل مادری (F=۰/۴۶; d.f.=۱۳۲،۵ ; P=۰/۸) و نتاج (F=۰/۸۲; d.f.=۵ ،۱۲۳; P=۰/۵۴) معنی‌دار نبود.



شکل ۳- زادآوری زنبورهای نسل مادری در دو سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده *Trichogramma brassicae* در شرایط آزمایشگاهی. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال% ۵ بر اساس آزمون توکی می‌باشند.

اثر زمان نگهداری تخم میزبان در درصد بی‌بالی زنبورهای پارازیتویید نسل مادری معنی‌دار نبود (d.f.=۵، ۱۳۲; P=۰/۵۴ ;F=۰/۸۲)، هر چند با افزایش زمان نگهداری تخم میزبان درصد بی-بالی در جمعیت افزایش یافت. اثر زمان نگهداری تخم میزبان در درصد بی‌بالی زنبورهای پارازیتویید نتاج معنی‌دار شد (۱۲۳; P=۰/۰۴ ، F=۲/۴۸; d.f.=۵) و بیشترین درصد بی‌بالی مربوط به زنبورهای پرورش یافته روی تخم میزبان با زمان نگهداری ۱۶ (۰/۲۴±۰/۵۴) بود. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد اندازه بال تحت تاثیر زمان نگهداری تخم میزبان متفاوت است. این پدیده ممکن است ناشی از تغییر در کیفیت موادغذایی میزبان‌های با زمان نگهداری بیشتر باشد. تاثیر کیفیت مواد غذایی میزبان به صورت کاهش اندازه زنبورهای خارج شده از میزبان مسن‌تر یا کوچک‌تر نیز نشان داده شده (۵)، و ثابت گردیده در پارازیتویید‌ها اندازه‌ی افراد بالغ، بسته به ویژگی‌های میزبان، مانند اندازه، سن و گونه آن متفاوت است (۲۲). فاکتور سوش زنبور در درصد بی‌بالی در نسل مادری معنی‌دار شد (P=۰/۰۰۱ ;F=۱۲/۶۷; d.f.=۱،۱۳۲) و در سوش آلوده به ولباخیا درصد بی‌بالی به طور معنی‌داری بیشتر بود (۰/۲۶±۰/۰۶)، اما این فاکتور در زنبورهای نسل نتاج معنی‌دار نشد (P=۰/۱۷ ; ۱۲۳، d.f.=۱ ; F=۱/۹۲). بر اساس اطلاعات ما این بررسی اولین تحقیق انجام شده در مورد مقایسه سوش آلوده به ولباخیا و غیرآلوده زنبور تریکوگراما از نظر بی‌بالی است و به تبع اولین گزارش از تأثیر منفی ولباخیا روی بی‌بالی زنبور تریکوگراما است.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این آزمایش‌ها بیانگر اثر منفی زمان نگهداری تخم میزبان روی بعضی ویژگی‌های زیستی زنبور تریکوگراما بود. طول دوره رشد و نمو، نسبت ظهور، زادآوری، طول عمر و بی‌بالی به طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان نگهداری تخم میزبان بودند. اما به دلیل تاثیر متفاوت زمان نگهداری تخم میزبان روی سوش آلوده و غیر آلوده به ولباخیا می‌توان با مدیریت بهینه در روند تولید انبوه تریکوگراما این اثرات منفی را به حداقل کاهش داد.

مطابق با نتایج بدست آمده نگهداری تخم‌های میزبان در سرما اثر منفی روی زمان رشد و نمو قبل از بلوغ *T. brassicae* داشت. به دلیل اثر منفی بسیار کمتر زمان نگهداری تخم میزبان روی سوش آلوده به ولباخیا که بوضوح در شکل یک مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد نگهداری تخم‌های میزبان در سرما برای پرورش سوش آلوده به ولباخیا یک روش مناسب باشد. در ضمن سوش آلوده به ولباخیا نیاز به جفت گیری ندارد که این امر در طی روند تولید می‌تواند زمان لازم برای تولید یک نسل را کاهش دهد.

با نگاهی به شکل شماره سه می‌توان دریافت که زمان نگهداری تخم میزبان بیشترین اثر را روی زاداوری سوش غیرآلوده داشته است و زاداوری سوش آلوده بین روز ۱ و ۱۶ تفاوت معنی‌داری ندارد. لذا می‌توان گفت نگهداری تخم میزبان باعث کاهش زاداوری سوش آلوده نشده است. اما همان طور که در این تحقیق نیز مشاهده کردیم در اکثر موارد تریکوگراما آلوده به ولباخیا زادآوری کمتری نسبت به

سوش غیرآلوده دارد (۱۴). استوتامر و لوک (۲۵) با به چالش کشیدن این اثر منفی از دیدگاه کاربردی بیان داشتند که به دلیل شرایط متفاوت در مزرعه، حشرات ماده تریکوگراما که در مزرعه رهاسازی می‌شوند تنها قادر به پارازیته کردن تعداد کمی میزبان در طول عمر خود هستند. تولید نتاج کمتر در سوش آلوده به ولباخیا تنها هنگامی مطرح است که این ویژگی در آزمایشگاه بررسی شود که شایستگی زنبورها با تعداد نتاج تولید شده در حضور تعداد میزبان نامحدود مورد بررسی قرار می‌گیرد. وقتی زادآوری زنبورها در شرایط تعداد محدود میزبان مورد مقایسه قرار می‌گیرد، سوش آلوده به ولباخیا تعداد نتاج بیشتری از سوش غیرآلوده تولید می‌کنند. محاسبات نیز نشان داده‌اند که با رهاسازی ۱۰۰ عدد زنبور از هر دو سوش (افراد ماده همراه نرها در سوش غیرآلوده) تعداد تخم‌های بیشتری توسط سوش آلوده به ولباخیا پارازیته می‌شود (۲۴). در نتیجه با وجود زادآوری کمتر سوش آلوده به ولباخیا، استعداد بالقوه بیشتری برای کنترل آفات نسبت به سوش غیرآلوده دارد (۲۴).

بر اساس نتایج این بررسی افزایش زمان نگهداری تخم میزبان باعث کاهش طول عمر می‌شود. ولی همان طور که نتایج مطالعات محققان دیگر (۱۱ و ۱۸) نیز نشان می‌دهد زنبورهای آلوده به ولباخیا طول عمر بیشتری نسبت به زنبورهای غیرآلوده دارند. لذا نگهداری تخم میزبان سوش آلوده در سرما اثر منفی نگهداری تخم میزبان را می‌تواند جبران نماید.

در این‌جا تنها اثر نامطلوب توجیه نشده توسط این آزمایش میزان بی‌بالی افراد بالغ است. اما باید توجه داشت که میزان بی‌بالی ۵۰ درصد فقط در نسل نتاج و آن هم در حشرات پرورش یافته روی میزبان‌های با زمان نگهداری ۱۶ روز مشاهده شده که در این زمان یک افزایش ناگهانی در تعداد افراد بی‌بال اتفاق افتاده است در حالی که در روزهای قبل از روز ۱۶ میزان بی‌بالی افراد بالغ تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

به طور کلی وجود اثرات مثبت ولباخیا روی طول عمر، نسبت جنسی و عدم تأثیر منفی روی پارازیتیسم تریکوگراما می‌تواند در بهبود کنترل بیولوژیک و تولید ارزان‌تر این عامل موثر باشد. البته برای تصمیم گیری قطعی در این زمینه توصیه می‌شود آزمایشاتی در مزرعه، روی کارایی پارازیتوئیدهای تحت اثر این تیمارها انجام شود تا به تاثیر نهایی آن‌ها در میزان کنترل آفات کشاورزی پی برد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه نگارنده اول می باشد که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه های تهران و فردوسی مشهد به جهت حمایت های مالی کمال تشکر را می نماییم.

منابع

۱- ابراهیمی ا.، پنتور ب. و شجاعی م. ۱۳۷۶. مطالعه مرفولوژیک و آنزیماتیک گونه های جنس *Trichogramma* در ایران. آفات و بیماری های گیاهی ۶۶: ۱۲۲-۱۴۱.

۲- ارباب تفتی ر.، صحرا گرد الف. و صالحی ل. ۱۳۸۰. تعیین قدرت پارازیتیسم زنبور پارازیتوییدTrichogramma brassicae در پرورش آن روی تراکم های مختلف تخم بید غلات. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. دانشگاه رازی. کرمانشاه.

۳- پورجواد ن. ۱۳۸۹. بررسی تاکسونومی جنس(Hym.: Trichogrammatidae) *Trichogramma* Westwood بر اساس صفات مرفولوژیکی، مولکولی و سازگاری تولید مثلی در استان‌های تهران و مازندران. رساله دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۱۳۸ صفحه.

۴- فرخی ش. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر باکتری ولباخیا بر ویژگی های زیستی زنبور *Trichogramma brassicae*. رساله دکتری. دانشگاه تهران. ۱۵۳ صفحه.

5-Bai B., Luck R.F., Forster L., Stephens B., and Janssen J.A.M. 1992. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. Entomologia Experimentalis et Applicata 64:37-48.

6-Colinet H., and Boivin G. 2011. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. Biological Control, 58:83-95.

7-De Almeida R.P. 2004. *Trichogramma* and Its Relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* Species, Phylogeny, Transfer and Costs of *Wolbachia* Symbionts, Ph.D. thesis, Wageningen University. Page 142.

8-Farrokhi S., Ashouri A., Shirazi J., Allahyari H., and Huigens M.E. 2010. A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. CORD Conference Proceedings 10:167-167.

9-Hance T., van Baaren J., Vernon P., Boivin G. 2007. Impact of extreme temperatures on parasitoids in a

climate change perspective. Annual Review of Entomology 52:107–126.
10-Hohmann C.L., Luck R.F. 2001. Effect of *Wolbachia* on the survival and reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Neotropical Entomology, 30: 607-612.
11-Hohmann C.L., Luck R.F., and Oatman E.R. 1988. A comparison of longevity and fecundity of adult *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared from eggs of the cabbage looper and the angumouis grain moth, with and without access to honey. Journal of Economic Entomology, 81:1307-1312.
12-Hoogenboom A., Silva I.M.M.S., Van Meer M.M.M., Roskam M.M., and Stouthamer R. 1998. Quality assessments of *Wolbachia* infected versus non infected lines of *Trichogramma deion*. P. 99-104. In. M.J. Sommeijer and P.J. Francke (ed.) Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society, N.E.V., Amsterdam, the Netherlands.
13-Horjus M., and Stouthamer R. 1995. Does infection with thelytoky-causing *Wolbachia* in the pre-adult and adult life stages influence the adult fecundity of *Trichogramma deion* and *Muscidifurax uniraptor*? P. 35-49. In. Sommeijer and P.J. Francke (ed.) Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society, N.E.V., Amsterdam, the Netherlands.
14-Huigens M.E., Hohmann C.L., Luck R.F., Gort G., and Stouthamer R. 2004. Reduced competitive ability due to *Wolbachia* infection in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 110:115-123.
15-Karimi J., Darsouei R., Hosseini M., Stouthamer R. 2010. Molecular characterization of Iranian Trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and their *Wolbachia* endosymbiont. Journal of Asia-Pacific Entomology, 15:73–77.
16-Kölliker-Ott U.M., and Blows M.W. 2003. Are wing size, wing shape and asymmetry related to field fitness of *Trichogramma* egg parasitoids? Oikos, 100:563-573.
17-Li, L.Y. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops:A survey. p. 37-53. In E.Wajnberg and S.A. Hassan (ed.) Biological Control with Egg Parasitoids CAB International, Wallingford, U.K.
18-Miura K., and Tagami Y. 2004. Comparison of life history characters of arrhenotokous and *Wolbachia*-associated thelytokous *Trichogramma kaykai* Pinto and Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Annals of the Entomological Society of America 97:765-769.
19-Nadeem S. 2010. Improvement in production and storage of *Trichogramma chilonis* Ishii, *chrysoperla carnea* (stephens) and their hosts for effective field releases against major insect pests of cotton. Ph.D. Thesis. University of agriculture, faisalabad, Pakistan. 2010. Page 186.
20-Pinto J.D. 1998. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Entomological Society of Washington, Washington D.C.
21-Querino R.B., and Zucchi R.A. 2003. New species of *Trichogramma* Westwood (Hymaneoptera: Trichogrammatidae) associated with lepidopterous eggs in Brazil. Zootaxa, 163:1-10.
22-Ruberson J.R., and Kring T.J. 1993. Parasitism of developing eggs by *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): host age preference and suitability. Biological Control, 3:39-46.
23-Russell J.E., and Stouthamer R. 2010. Sex ratio modulators of egg parasitoids. p. 167-190. In. F.L. Cônsoli et al. (ed.) Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
24-Silva I.M.M.S., Van Meer M.M.M., Roskam M.M., Hoogenboom A., Gort G., and Stouthamer R. 2000. Biological control potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strains. Biocontrol Science and Technology, 10:230-238.
25-Stouthamer R., and 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.
26-Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Luck R.F., and Werren J.H. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. Nature, 361:66–68.
27-Tagami Y., Miura K., and Stouthamer R. 2001. How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? Journal of Invertebrate Pathology, 78:267-271.
28-Tuncbilek A.S., Canpolat U., and Summer F. 2005. Use of radiation in extending the duration of host suitability for managing *Ephestia kuehniella* and *Sitotroga cerealella* by the egg parasitoid, *Trichogramma evanescens*. FAO/IAEA International conference on area wide control of insect pests:

Integrating the sterile insect and related nuclear and other techniques, 2005, Vienna, Austria.
29-Van Lenteren J.C., and Bigler F. 2010. Quality control of mass reared egg parasitoids. P. 315–340 In: F.L. Cônsoli et al. (ed) Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
30-Venkatesan T., Singh S.P., and Jalali S.K. 2000. Effect of cold storage on cocoons of *Goniozus nephantidis* Muesebeck (Hymenoptera: Bethylidae) stored for varying periods at different temperature regimes. Journal of Entomological Research, 24:43–47.
31-Vereijssen J.I., Silva I.M.MS., Honda J., and Stouthamer R. 1997. Development of a method to predict the biological control quality of *Trichogramma* strains. P. 145-149. In. M.J. Sommeijer and P.J. Francke (ed.) Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society, N.E.V., Amsterdam, the Netherlands.
32-Williams J.C., Weiss E., and Dasch G.A. 1991. The genera Coxiella, *Wolbachia* and Rickettsiella. p. 2471–2483. In A. Balows et al. (ed.) The Prokaryotes, Springer-Verlag, New York.