تحقیقات آفات گیاهی
۱۴۰۰ -۱۱(۲): ۵۳-۶۶

علمی پژوهشی

باکتری *Wolbachia* و ناسازگاری سیتوپلاسمی در زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* (Hym.: Braconidae)

سیده فاطمه ناصحی ، یعقوب فتحی‌پور و محمد مهرآبادی*
دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸)

چکیده

ناسازگاری سیتوپلاسمی (CI) معمول‌ترین دستکاری تولیدمثلی القا شده توسط باکتری اجباری درون‌سلولی *Wolbachia* است، که در صورت جفت‌گیری نرهای آلوده با ماده غیرآلوده اتفاق می‌افتد. حاصل ناسازگاری در گونه‌های دیپلوئید، مرگ جنینی است و در گونه‌های هاپلودیپلوئید ناسازگاری به دو شکل اتفاق می‌افتد: توسعه تخم‌های بارور به نر (Male development) و مرگ و میر ماده (Female mortality). زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* آلوده به استرین القاکننده ناسازگاری باکتری *Wolbachia* است. در پژوهش حاضر، از زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* آلوده به استرین القاکننده ناسازگاری باکتری *Wolbachia* استفاده شده است؛ بدین صورت که پس از حذف *Wolbachia* با آنتی‌بیوتیک، نوع ناسازگاری در این زنبور پارازیتوئید، با مقایسه بین تعداد کل نتاج و تعداد نرهای تولید شده و مرحله‌ای که بیشترین مرگ و میر اتفاق می‌افتد، در تلاقی سازگار و ناسازگار تعیین شد. همچنین، اثر دما بر شدت بروز ناسازگاری با مقایسه تعداد نتاج در سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس در دو تلاقی تعیین شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تعداد کل نتاج در تلاقی ناسازگار در مقایسه با تلاقی سازگار کمتر است، در صورتی که اختلافی در تعداد نرهای تولید شده وجود ندارد. همچنین، بیشترین مرگ و میر مربوط به مرحله‌ی تفریخ تخم است. در نهایت، دمای بالا در تلاقی ناسازگار منجر به افزایش تعداد کل نتاج و کاهش شدت ناسازگاری شد. مطابق با نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد در این زنبور پارازیتوئید ناسازگاری از نوع مرگ و میر ماده است. این نتایج جزئیات بیشتری از برهمکنش میزبان- *Wolbachia* را ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *Wolbachia*، ناسازگاری سیتوپلاسمی، مرگ و میر ماده، زنبور پارازیتوئید

* نویسنده مسئول: m.mehrabadi@modares.ac.ir

مقدمه

باکتری اجباری درون‌سلولی *Wolbachia* یکی از فراوان‌ترین همزیست‌ها در میان حشرات، کنه‌ها و نماتدها است. حداقل ۴۰ درصد از جمعیت گونه‌های مختلف حشرات به این باکتری درون‌سلولی آلوده هستند (Werren, 1997). *Wolbachia* به طور عمده به عنوان پارازیت سیستم تولید-مثلی شناخته می‌شود، اما در میزبان‌های بسیاری این باکتری به صورت همزیست حضور دارد (Weinert *et al*., 2015). دستکاری‌های تولیدمثلی *Wolbachia* در میزبان به روش-های مختلف، همچون نرکشی[1](Hurst *et al*., 1999)، بکرماده‌زایی[2](Stouthamer *et al*., 2008)، مونث‌سازی نرها[3](Rousset *et al*., 1992) و ناسازگاری سیتوپلاسمی (CI)[4]که به عنوان مهم‌ترین و معمول‌ترین شیوه دستکاری است، اتفاق می‌افتد (Yen and Barr, 1971). ناسازگاری یک سویه[5]بین اسپرم و تخمک در صورت جفت‌گیری نرهای آلوده به باکتری با ماده‌های غیرآلوده اتفاق می‌افتد، در حالی که در صورت جفت‌گیری حشرات آلوده به استرین‌های مختلفی از باکتری *Wolbachia* ناسازگاری به صورت دو سویه[6]خواهد بود (O'Neill and Karr, 1990; Hunter *et al*., 2003). حاصل هر دو نوع ناسازگاری در گونه‌های دیپلوئید، مرگ و میر جنینی و در گونه‌های هاپلودیپلوئید مانند زنبورهای پارازیتوئید، نرزایی است (Moran *et al*., 2008). از آنجا که *Wolbachia* تنها به صورت عمودی و از طریق سیتوپلاسم تخم به نسل بعد منتقل می‌شود، این باکتری منجر به برتری تولیدمثلی افراد ماده آلوده نسبت به افراد غیرآلوده می‌شود (Werren *et al*., 2008). اثرات القا شده توسط باکتری *Wolbachia* با افزایش تعداد افراد آلوده به گسترش سریع این باکتری در جمعیت‌های میزبان کمک می‌کند (Moran *et al*., 2008).

ناسازگاری سیتوپلاسمی با تغییر در اسپرم حشرات نر آلوده منجر به تاخیر در تخریب پوشش هسته‌ی پرونوکلئوس نر (نسبت به پرونوکلئوس ماده) شده و نتیجه آن، تراکم نامناسب کروموزوم‌های پدری بعد از بارور شدن تخم‌های غیرآلوده و رشد و نمو غیرعادی جنین است، به طوری که تنها جدایی کروموزوم‌های مادری اتفاق افتاده و کروموزوم پدری را از دست می‌دهد، که در نهایت، در زنبورهای پارازیتوئید، منجر به تولید نتاج نر هاپلوئید خواهد شد. این در حالی است که آلودگی تخم به استرین یکسانی از باکتری منجر به رشد و نمو عادی جنین می‌شود (Tram *et al*., 2003; Landmann *et al*., 2009).

بروز ناسازگاری در میزبان به دو روش توسعه جنین به نر (MD)[7] و مرگ و میر ماده (FM)[8] اتفاق می‌افتد (Breeuwer, 1997; Vavre *et al*., 2000). در نوع MD کروموزوم پدری به طور کامل تخریب و حذف می‌شود که با ایجاد تخم‌های هاپلوئید به نر توسعه می‌یابد، در نوع FM، به دلیل جدایی ناقص کروموزوم‌ها و ایجاد جنین غیرعادی، مرگ و میر اتفاق می‌افتد (Bonneau *et al*., 2018). بررسی‌های انجام شده با تعیین نوع CI در حشرات مختلف به ویژه زنبورهای پارازیتوئید، عوامل بسیاری را موثر بر نوع CI معرفی کرده است. یکی از این عوامل، پیشینه ژنتیکی میزبان می‌باشد، به‌گونه‌ای که در جنس‌های مختلف از زنبور پارازیتوئید *Nasonia spp*. ناسازگاری به صورت MD و یا FM اتفاق می‌افتد (Bordenstien *et al*., 2003). همچنین، فاکتورهای مربوط به باکتری نیز می‌تواند بر تفاوت نوع CI موثر باشد (Bordenstien *et al*., 2003). در زنبور

---

1. Male killing
2. Parthenogenesis
3. Feminization
4. Cytoplasmic incompatibility
5. Unidirectional
6. Bidirectional
7. Male development
8. Female mortality

پارازیتوئید *Leptopilina heterotoma* (Thomson)، آلودگی همزمان به سه استرین از *Wolbachia*، منجر به القا ناسازگاری کامل و مرگ و میر ماده می‌شود. حضور تنها یک استرین از *Wolbachia* در این زنبور پارازیتوئید به تنهایی منجر به بروز ناسازگاری با شدت متوسط شده و حالتی بین مرگ و میر ماده و توسعه به نر را ایجاد و در نهایت، منجر به مرگ برخی از تخم‌های بارور می‌شود؛ در حالی که برخی دیگر از این تخم‌ها به جنین هاپلوئید توسعه می‌یابند (Mouton *et al*., 2005). بنابراین، نوع CI وابسته به عوامل مختلفی همچون میزبان، استرین باکتری و حتی برهمکنش بین استرین‌های مختلف از باکتری *Wolbachia* است (Bordenstein *et al*., 2003). بررسی نوع CI یکی از جنبه‌های تکاملی در برهمکنش میزبان-*Wolbachia* است که با تغییر از نوع MD به FM منجر به کاهش اثرات *Wolbachia* در میزبان‌هایی با تکامل همسو[1] می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003).

حضور باکتری *Wolbachia* و همچنین، فاژ WO در زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* (Say) در بررسی‌های قبل گزارش شده است. همچنین، گزارش شده است که *Wolbachia* در راستای پراکنش خود نسبت جنسی میزبان را به سود خود تغییر می‌دهد و با دستکاری سیستم تولید مثلی میزبان منجر به القای ناسازگاری سیتوپلاسمی در این زنبور پارازیتوئید می‌شود (Bagheri *et al*., 2019*a*; Nasehi *et al*., 2021).

زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* به عنوان عامل مهم در کنترل بیولوژیک مراحل لاروی تعدادی از آفات در انبار و به ویژه بال‌پولکداران از جمله حشرات خانواده Pyralidae است (Ghimire *et al*., 2008). نسبت جنسی در زنبورهای پارازیتوئید از اهمیت زیادی برخوردار است؛ چرا که در صورت تولید ماده بیشتر، علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید انبوه، زمان لازم برای تولید نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، در این مطالعه با تعیین نوع CI به جنبه تکاملی در برهمکنش *Wolbachia* و *H. hebetor* پرداخته شده است تا مشخص شود میزبان و باکتری در چه مرحله ای از تکامل قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

به منظور تشکیل کلنی اولیه *Anagasta kuehniella* تخم‌های این حشره، از کلنی موجود در آزمایشگاه پرورش حشرات گروه حشره‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. برای پرورش شب‌پره آرد، یک کیلوگرم آرد گندم، ۲۰۰ گرم سبوس و ۲۰ گرم مخمر درون ظرف پلاستیکی (ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۰/۴ سانتی‌متر) با هم مخلوط شدند. سپس، ۰/۲ گرم تخم شب‌پره آرد به صورت یکنواخت روی سطح آرد گندم پخش شد (Badran *et al*., 2020). ظرف‌های حاوی تخم شب‌پره آرد در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی۱۰±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، داخل قفسه‌های اتاق پرورش موجود در آزمایشگاه برای گذراندن دوره لاروی قرار داده شدند.

همچنین، برای تهیه کلنی اولیه از زنبور *H. hebetor* از مزرعه ارگانیک گوجه‌فرنگی واقع در محمدشهر کرج نمونه‌برداری انجام شد. پرورش زنبور پارازیتوئید درون ظرف‌های پلاستیکی شفاف انجام شد و برای تغذیه حشرات از آب و عسل رقیق شده (با نسبت ۵۰ درصد) و از لارو سن پنج شب‌پره آرد، *A. kuehniella* به عنوان میزبان این زنبور پارازیتوئید استفاده شد. لاروهای پارازیته روزانه تعویض و تا زمان تفریخ تخم‌ها و ظهور حشرات بالغ زنبور، در ظرف‌های جداگانه نگه‌داری شدند. پس از ۱۰ روز برای جلوگیری از کاهش کارایی تولیدمثلی، زنبورها تعویض شدند. رشد و پرورش شب‌پره آرد و زنبور *H. hebetor* در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی۱۰±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انجام شد.

[1].Coevolve

حذف باکتری *Wolbachia* در زنبور پارازیتوئید

به منظور بررسی نوع CI در تلاقی ناسازگار در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor*، از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با غلظت ۰/۲ درصد همراه با آب و عسل استفاده شد (Bagheri *et al*., 2019a; Nasehi *et al*., 2021)؛ به این صورت که به حشرات بالغ یک روزه، ۲۴ ساعت گرسنگی داده شد و سپس، به مدت هفت روز با آب و عسل همراه با آنتی‌بیوتیک تغذیه شدند. این کار تا سه نسل ادامه داشت. سپس، در نسل چهارم به منظور تایید حذف همزیست، استخراج DNA از ۱۰ زنبور تیمار شده با آنتی-بیوتیک انجام شد و نمونه‌های DNA برای تایید حذف *Wolbachia* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز کیفی[1] و کمی[2]مورد استفاده قرار گرفتند.

پس از اطمینان از حذف باکتری همزیست، از آب و عسل (با نسبت ۵۰ درصد) بدون آنتی‌بیوتیک برای تغذیه حشرات تیمار شده استفاده شد. به منظور جلوگیری و حذف اثر احتمالی آنتی‌بیوتیک بر حشرات تیمار شده، همه آزمایش‌ها در نسل‌های ۱۰ به بعد انجام شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز

برای بررسی حذف باکتری *Wolbachia* از زنبورهای پارازیتوئید، ۱۰ زنبور به صورت تصادفی انتخاب و استفاده شد. استخراج DNA از زنبورهای انتخاب شده مطابق دستورالعمل شرح داده شده در بررسی‌های قبل انجام شد (O'Neill *et al*., 1992). برای تکثیر ژن *wsp* (ژن پروتئین سطحی *Wolbachia*) با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز کیفی و کمی، از پرایمر اختصاصی ژن *wsp*: *wsp81F* (TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC) و *wsp691R* (AAAAATTAAACGCTACTCCA) استفاده شد (Narita *et al*., 2007). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کیفی مخلوط PCR (۲۰ میکرولیتر) شامل ۴ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر(Amplicon) Master mix red، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت و ۴ میکرولیتر از نمونه DNA پس از تعیین غلظت با دستگاه EPOCH آماده شد. واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (model: FTG6T5D Touchgene Gradiant, Eppendorf) با شرایط دمایی شرح داده شده در پژوهش‌های قبل (Narita *et al*., 2007) انجام شد. الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد انجام شد.

برای بررسی کمی *Wolbachia* در جمعیت آلوده و تیمارشده، از ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر (Amplicon) Master mix sybergreen، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۲ میکرولیتر از DNA و ۲ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز استفاده شد. همچنین، برای بررسی کمی از ژن *18SrRNA* به‌عنوان رفرنس (Karamipour *et al*., 2016) و از دستگاه Real Time (Bio Molecular System PCR) مدل micPCR با برنامه تعیین شده استفاده شد (Nasehi *et al*., 2021).

بررسی نوع CI

به منظور بررسی نوع CI در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor*، سه تلاقی سازگار (ماده آلوده با نر غیرآلوده، نرآلوده با ماده آلوده و نر غیرآلوده با ماده غیرآلوده) و ناسازگار (ماده غیرآلوده با نر آلوده) با استفاده از حشرات نر و ماده جفت‌گیری نکرده، از جمعیت آلوده و جمعیت تیمار شده، استفاده شد. همچنین، به منظور بررسی اثر سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس، ابتدا تعدادی تخم از لاین دارای همزیست و لاین بدون همزیست، به صورت جداگانه در ژرمیناتورهایی با دماهای مورد نظر قرار داده شد. برای این آزمایش، شفیره‌ها از هر دو لاین دارای همزیست و بدون همزیست، به صورت جداگانه در ظرف‌های پلاستیکی شفاف مستطیلی (طول و عرض ۳×۵ سانتی‌متر) تا زمان ظهور حشرات بالغ نگه‌داری شدند. برای هر تلاقی ۲۰ جفت حشره انتخاب و هر جفت به صورت جداگانه در ظرف‌های شفاف

1. Polymerase chain reaction (PCR)
2. q-PCR

(ارتفاع ۷ و قطر ۵ سانتی‌متر) نگه‌داری شدند. برای اطمینان از جفت‌گیری، حشرات بالغ به مدت ۲۴ ساعت بدون میزبان نگه‌داری و با آب و عسل تغذیه شدند. پس از جفت‌گیری، به ازای هر زنبور ماده چهار عدد لارو شب‌پره آرد برای تخمریزی در اختیار زنبورهای ماده قرار گرفت و به ژرمیناتور با شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شد. به مدت دو روز، تعداد تخم، درصد تفریخ تخم، درصد تشکیل شفیره، درصد ظهور حشرات بالغ، تعداد کل نتاج و نسبت جنسی ثبت شد.

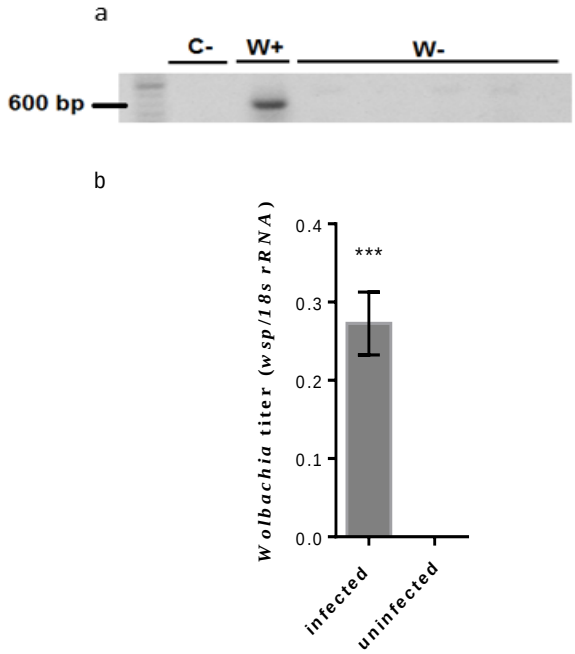
تجزیه و تحلیل داده‌ها

بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov–Smirnov انجام شد. بررسی تراکم باکتری *Wolbachia* با استفاده از t مستقل[1] انجام شد. همچنین، مقایسه میانگین داده‌های نرمال با آزمون توکی[2] در سطح ۰/۰۵ انجام شد. مقایسه میانگین تعداد تخم، نرخ تفریخ، درصد تشکیل شفیره، درصد ظهور حشرات بالغ و نسبت جنسی با استفاده از آزمون Mann-Whitney و با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه[3] دو طرفه[4] و t مستقل انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزارهای Graph Pad Prism 7 و SPSS 17 انجام شد.

نتایج

حذف باکتری *Wolbachia* در زنبور پارازیتوئید

به منظور تایید حذف باکتری *Wolbachia* در زنبورهایی که از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین تغذیه کرده بودند، استخراج DNA و واکنش PCR با پرایمر اختصاصی *wsp*



شکل ۱- مقایسه تراکم باکتری *Wolbachia* با استفاده از a) PCR و b) qPCR، بین زنبورهای پارازیتوئید *H. hebetor* آلوده به باکتری (infected-W$^+$) و زنبورهای تیمار شده با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (uninfected-W$^-$) ($P < 0.001$)

Figure 1. Comparison of *Wolbachia* densites, between infected (W$^+$) and tetracycline treated (W$^-$) of parasitoid wasp, *H. hebetor* using by a) PCR and b) qPCR

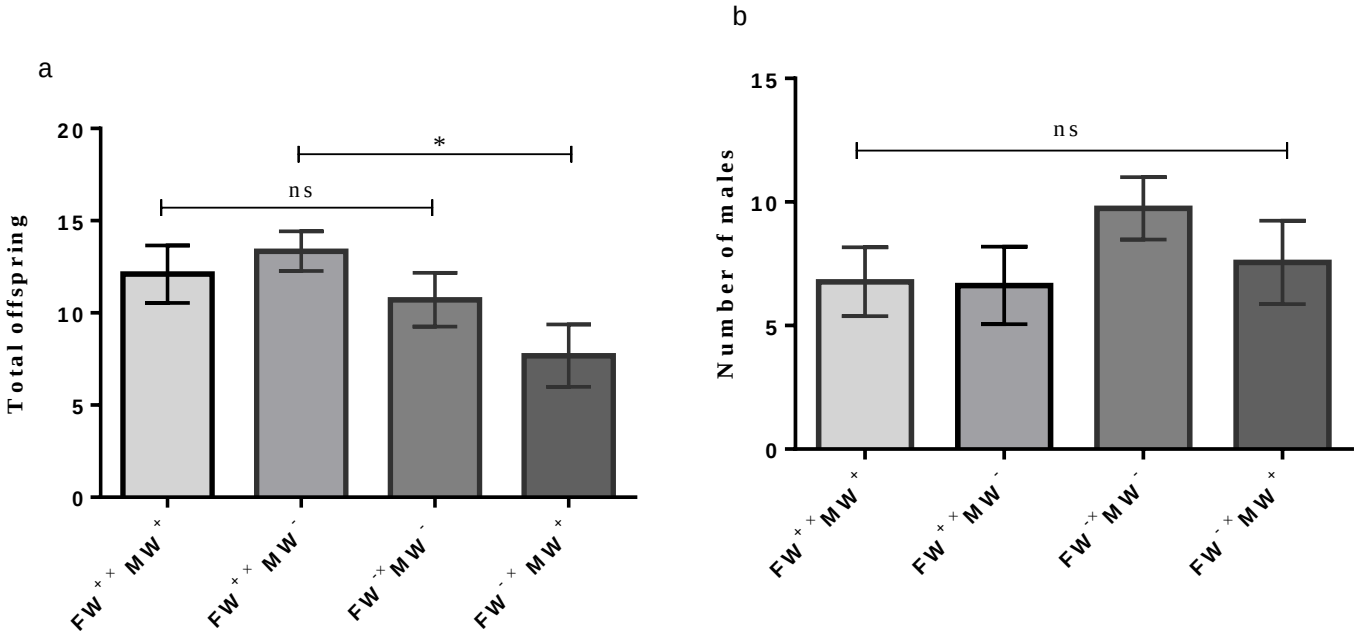
[1]. t-test
[2]. Tukey
[3]. One-way ANOVA
[4]. Two-way ANOVA

آلوده و تیمار شده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و مشخص شد که ژن مورد نظر در جمعیت تیمار شده با آنتی بیوتیک تکثیر نشده است که نشان‌دهنده حذف باکتری است (شکل ۱a). همچنین، حذف این باکتری درون سلولی از زنبورهای تیمارشده با آنتی بیوتیک با انجام qPCR تایید شد (شکل ۱b) ($P = 0.0001$).

تعیین نوع CI در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor*

به منظور بررسی و تعیین نوع ناسازگاری القا شده توسط *Wolbachia* در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor*، چهار تلاقی ایجاد شد. در تلاقی ناسازگار که تنها حشرات نر آلوده به باکتری هستند، تعداد نتاج کمتری در مقایسه با سه تلاقی سازگار مشاهده شد (شکل ۲a) ($P < 0.05$)، در حالی که تعداد نرهای تولید شده به ازای هر فرد ماده در هر چهار تلاقی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲b). کاهش کل نتاج در تلاقی ناسازگار با وجود عدم تفاوت در نرهای تولید شده، نشان می‌دهد در این زنبور پارازیتوئید ناسازگاری از نوع مرگ و میر ماده (FM) است.

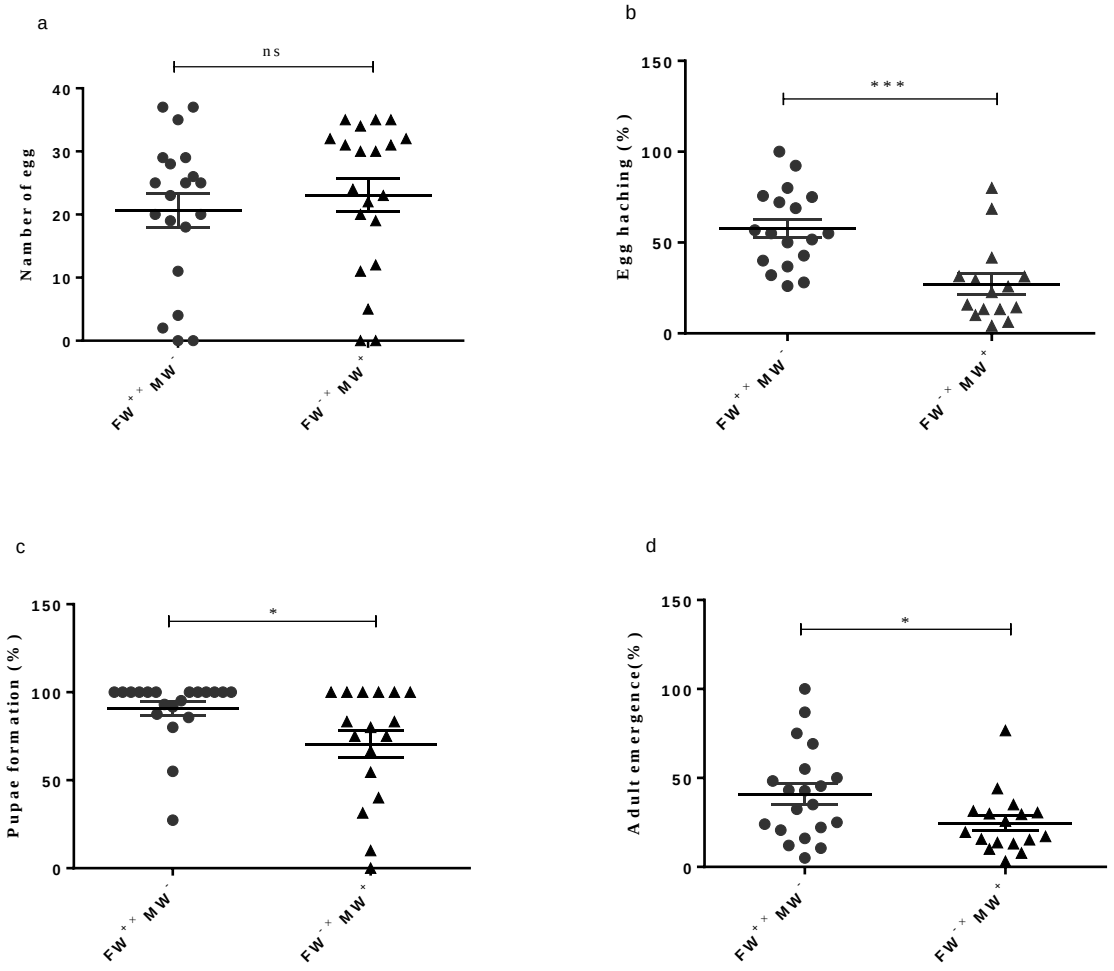
مقایسه انجام شده بین تعداد کل تخم‌های تولید شده در تلاقی سازگار و ناسازگار، تفاوتی را نشان نمی‌دهد (شکل ۳a)، که با توجه به ثابت بودن تعداد نرهای تولید شده، مرگ و میر ماده منجر به کاهش نتاج شده است. همچنین، درصد تفریخ تخم، درصد تشکیل شفیره و درصد ظهور حشرات بالغ در تلاقی ناسازگار کمتر از تلاقی سازگار است.



شکل ۲- مقایسه میانگین a) تعداد کل نتاج و b) تعداد نر به ازای یک ماده در چهار تلاقی بین افراد آلوده به باکتری *Wolbachia* (W^{+}) و افراد غیرآلوده (W^{-}). ماده(F)، نر(M). ns : اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها وجود ندارد (* $P < 0.05$).

Figure 2. Comparison of a) the mean total offspring and b) the mean number of males per female in four crosses between *Wolbachia* infected (W^{+}) and uninfected (W^{-}) individuals. Female (F), Male (M), ns: There is no significant difference between the means of the data (P< 0.05*)

به منظور بررسی مرگ و میر ایجاد شده به دلیل ناسازگاری، مراحل توسعه این زنبور پارازیتوئید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، مرگ و میر شدیدی در مرحله تفریخ تخم و طی توسعه جنین اتفاق می‌افتد (شکل ۳b) (P = 0.0004)؛ در حالی که در سایر مراحل توسعه همچون مرحله‌ی شفیرگی و ظهور حشرات بالغ، سطح مرگ و میر مشابه بوده و کمتر از مرگ و میر در مرحله تفریخ تخم است (شکل ۳c, d) (P = 0.0238 و P = 0. 0348).



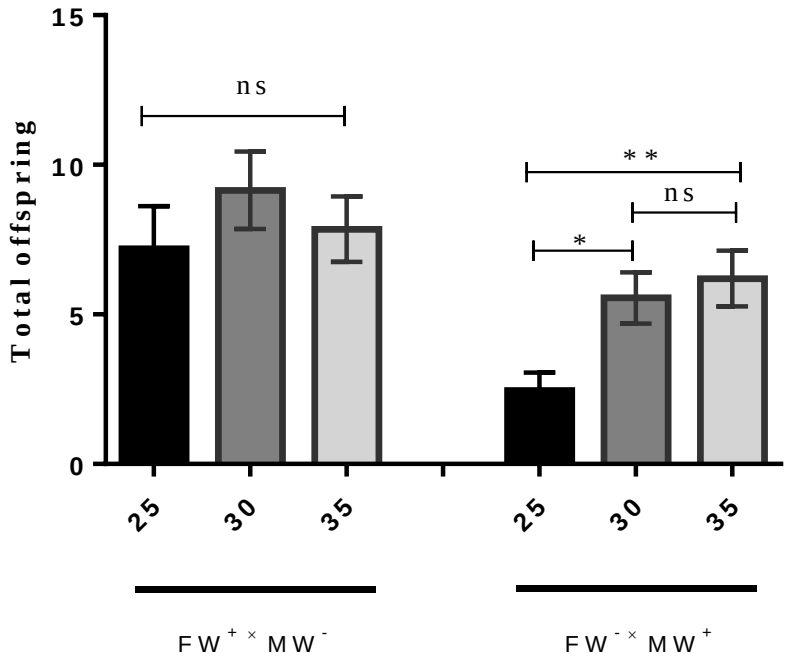
شکل ۳- مقایسه پارامترهای زیستی در چهار تلاقی بین افراد آلوده به باکتری *Wolbachia* (W^+) و افراد غیر آلوده (W^-) در دو روز. a) مقایسه میانگین تعداد تخم به ازای یک ماده ، b) درصد تفریخ تخم به ازای یک ماده ، c) درصد تشکیل شفیره به ازای یک ماده ، d) درصد کل نتاج به ازای یک ماده. ماده (F)، نر (M). ns : اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها وجود ندارد (P < 0.05*; P < 0.001***).

Figure 3. Comparison of biological parameters in four crosses between *Wolbachia* infected (W^+) and uninfected (W^-) individuals in two days. a) comparision of the mean number of eggs per female. b) hatching rate per female. c) Percentage of pupal formation per female. d) Percentage progeny emergance per female. Female (F), Male (M). ns: there is no significant difference between the means of the data. (* P < 0.05; ***signifies P < 0.001)

از آنجا که تراکم باکتری در بافت‌های تولیدمثلی میزبان در شدت اثرات القا شده توسط *Wolbachia* موثر است، دمای بالا به عنوان عامل محیطی برای کاهش تراکم باکتری و شدت اثرات در این زنبور پارازیتوئید مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه بین تعداد کل نتاج در دمای بالا، روندی افزایشی را در تلاقی ناسازگار نشان می‌دهد. در دمای بالا ۳۵ درجه سلسیوس با کم شدن تراکم باکتری، مرگ و میر حاصل از بروز ناسازگاری در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاهش می‌یابد، در حالی که در تلاقی سازگار در هر سه دما تفاوتی در تعداد نتاج تولید شده مشاهده نشد (شکل ۴) ($P = 0.0038$).

بحث

ناسازگاری سیتوپلاسمی به عنوان مهم‌ترین و معمول‌ترین دستکاری تولیدمثلی توسط باکتری *Wolbachia* است که تاکنون از راسته‌های مختلفی از حشرات گزارش شده است (Moran *et al*., 2008; Shropshire *et al*., 2020). این باکتری، برای اولین بار در پشه‌های *Culex* مشاهده شد و در پژوهش‌های بعد، اثر *Wolbachia* در بروز ناسازگاری به اثبات رسید (Werren *et al*., 2008). ناسازگاری در صورت جفت‌گیری نرهای آلوده به باکتری *Wolbachia* با ماده‌های غیرآلوده و یا افراد آلوده به استرین‌های مختلف اتفاق می‌افتد (Kaur *et al*., 2021).



شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد کل نتاج به ازای یک ماده در تلاقی سازگار و ناسازگار در سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس. افراد آلوده به باکتری *Wolbachia* (W^+) و افراد غیرآلوده (W^-). ماده (F)، نر(M). ns بیانگر عدم اختلاف معنادار بین میانگین داده‌ها است. ($P < 0.01$** ; $P < 0.05$*).

Figure 4. Comparison of the mean total offspring per female in compatible and incompatible crosses at three temprerature 25, 30 and 35 °C. *Wolbachia* infected (W^+) and uninfected (W^-) individuals. Female (F), Male (M), ns: there is no significant difference between the means of the data (*$P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

پژوهش‌های انجام شده، نشان داده است که در صورت جفت‌گیری نر آلوده به *Wolbachia* و ماده غیرآلوده، نقص شدیدی در اولین میتوز ایجاد می‌شود. در این تلاقی، جنینی تولید می‌شود که در آن کروموزوم‌های پدری در مرحله متافاز اولین تقسیم میتوزی پس از لقاح به طور نامنظم متراکم می‌شوند و در مرحله آنافاز کروماتیدهای خواهری جدا نشده و یا قطعه قطعه می‌شوند (Bonneau *et al*., 2018). چنین نقص کروموزومی منجر به تاخیر در تکثیر DNA و پیشرفت چرخه سلولی شده که این ناهنجاری در نهایت با مرگ و میر جنینی همراه است؛ در حالی که در صورت آلودگی هر دو حشره به استرینی یکسان و مشابه چنین نقصی اتفاق نمی‌افتد (Landmann *et al*., 2009). بررسی‌های اخیر سازوکار مولکولی ناسازگاری سیتوپلاسمی را بررسی کرده و دو ژن *cifA* و *cifB* را به عنوان ژن‌های مسئول در بروز ناسازگاری معرفی کرده است (LePage *et al*., 2017).

حاصل ناسازگاری سیتوپلاسمی در گونه‌های دیپلوئید، مرگ‌ومیر جنینی است (Shropshire *et al*., 2020)؛ اما درگونه‌های هاپلودیپلوئید ناسازگاری به دو صورت اتفاق می افتد؛ در زنبور پارازیتوئید *N. vitripennis* (Walker) ناسازگاری منجر به حذف کروموزوم پدری و تولید نتاج هاپلوئید می‌شود که به جنس نر (MD) توسعه می‌یابد (Bordenstein *et al*., 2003). این در حالی است که در سایر زنبورهای پارازیتوئید مانند زنبور *L. heterotoma* نوع دیگری از ناسازگاری اتفاق می‌افتد (Mouton *et al*., 2005)، مرگ و میر ماده (FM) حاصل ناسازگاری در این حشرات است که مشابه با ناسازگاری در گونه های دیپلوئید می‌باشد(Gebiola *et al*., 2017).

حضور باکتری *Wolbachia* با بروز ناسازگاری سیتوپلاسمی در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* همراه است و منجر به تغییر نسبت جنسی به سود نرها در این زنبور می‌شود (Bagheri *et al*., 2019a). در پژوهش حاضر، به بررسی نوع CI در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* پرداخته شد. تیمار آنتی‌بیوتیکی و حذف باکتری از جمعیت میزبان، امکان ایجاد تلاقی ناسازگار و بررسی نوع CI را فراهم می‌کند (شکل ۱a, b). بر اساس نتایج، کاهش تعداد نتاج در تلاقی ناسازگار در مقایسه با تلاقی سازگار نشان دهنده مرگ و میر ناشی از ناسازگاری بین اسپرم حاصل از نر آلوده و تخمک ماده غیرآلوده به باکتری *Wolbachia* می‌باشد. این در حالی است که در تلاقی ناسازگار تفاوتی در تعداد نر مشاهده نشد. الگوی متفاوتی از ناسازگاری سیتوپلاسمی در زنبور *N. vitripennis* منجر به کاهش تعداد نتاج و افزایش تعداد نرها می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003). همچنین، ناسازگاری در دو گونه زنبور پارازیتوئید *N. giralti* (Darling) و *N. longicornis* (Darling) نیز منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد نتاج، تعداد ماده‌ها و تعداد ظهور بالغین می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003). بررسی‌های انجام شده توسط بردناشتاین وهمکاران (Bordenstein *et al*., 2003)، نشان‌دهنده اهمیت ژنوتیپ میزبان در بروز ناسازگاری سیتوپلاسمی است. علاوه بر این، ژنوتیپ ماده غیرآلوده نیز می‌تواند بر نوع ناسازگاری در زمان بارور شدن تخم با اسپرم ناسازگار موثر باشد. ناسازگاری در *N. vitripennis* از نوع توسعه به نر است که با حذف ماده ژنتیکی اسپرم و جایگزین کردن آن با پروتئین‌های ماده ژنتیکی مادری، پوشش هسته، شکل گرفته و تکثیر اتفاق می‌افتد (Bordenstein *et al*., 2003)، اما در دو گونه‌ی *N. giralti* و *N. longicornis* مرگ ومیر ماده مشاهده می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003). بنابراین، با توجه به تفاوت در ژنوتیپ میزبان، نتیجه برهمکنش میزبان‌های مختلف با باکتری *Wolbachia* ممکن است متفاوت بوده و ناسازگاری سیتوپلاسمی به صورت‌های متفاوتی حتی درگونه های مختلف از یک جنس اتفاق بیافتد.

ناسازگاری سیتوپلاسمی منجر به کاهش توانمندی ماده‌های غیرآلوده در مقایسه با ماده های آلوده به باکتری می‌شود، زیرا به گسترش باکتری در جمعیت میزبان کمک می‌کند (Kaur *et al*., 2021)؛ اما ناسازگاری هزینه‌هایی را برای میزبان به دنبال دارد، بنابراین تضاد و تکامل بین باکتری و میزبان در این برهمکنش موثر است؛ به‌گونه‌ای که می‌تواند

منجر به تکامل ژنوتیپ میزبان با تاثیر بر نوع فنوتیپ القا شده توسط باکتری باشد. از آنجا که باکتری اثرات منفی در توانمندی میزبان دارد، فشار تکاملی منجر به کم شدن اثرات منفی ایجاد شده در میزبان توسط باکتری می‌شود (Shropshire *et al*., 2020).

در زنبورهای پارازیتوئید، درون همزادی با تولید نرهای دیپلوئید عقیم و با زنده‌مانی کمتر همراه است. از این رو، رفتار پرهیز از درون‌زادی در برخی حشرات مشاهده می‌شود (Charlesworth and Willis, 2009). در زنبورهایی با ساختار جمعیتی برون‌زاد همچون *N. vitripennis* ناسازگاری از نوع MD اتفاق می‌افتد، در حالی که در جمعیت هایی با ساختار درون زادی همچون *N. giralti* و *N. longicornis* ناسازگاری از نوع FM است. بنابراین به نظر می‌رسد در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* که ناسازگاری از نوع FM است، ساختار جمعیتی مشابه دو گونه‌ی ذکر شده می‌باشد (Bordenstein *et al*., 2003; Bluher *et al*., 2020). در ارتباط با این موضوع، رفتار پرهیز از درون‌زادی و تاثیر باکتری *Wolbachia* بر آن در *H. hebetor* نیز گزارش شده است (Bagheri *et al*., 2019b).

مقایسه مرگ و میر در مراحل مختلف توسعه نشان می‌دهد که مرگ و میر شدیدی در زمان تفریخ تخم اتفاق می‌افتد (شکل ۳b). اگرچه در مرحله شفیرگی و ظهور حشرات بالغ نیز تفاوت وجود دارد (شکل ۳c, d)، اما به نظر می‌رسد شدیدترین مرگ و میر در مرحله تخم به لارو سن اول اتفاق افتاده است (شکل ۳b). در زنبورهای *N. vitripennis* و *N. longicornis* نیز بیشترین میزان مرگ و میر در مرحله تبدیل تخم به لارو سن اول مشاهده شد (Bordenstein *et al*., 2003). در زنبور *H. hebetor* مرگ و میر در این مرحله وابسته به تراکم است و با افزایش دسته‌های تخم و حضور لاروهای مسن‌تر افزایش می‌یابد (Ghimire *et al*., 2008).

همچنین، در پژوهش حاضر، مقایسه تعداد کل نتاج تولید شده در تلاقی سازگار و ناسازگار در دمای بالا نشان‌دهنده افزایش نتاج و یا به عبارتی کاهش مرگ و میر در دمای بالا با کم شدن تراکم باکتری *Wolbachia* است (شکل ۴). تراکم *Wolbachia* در بافت‌های تولیدمثلی میزبان عامل بسیار مهمی در شدت اثرات القا شده توسط باکتری است (Kent *et al*., 2010; Ross *et al*., 2017). در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، تراکم *Wolbachia* در زنبور *H. hebetor* کاهش می‌یابد و به دنبال آن، شدت ناسازگاری کاهش می‌یابد (Nasehi *et al*., 2021). کاهش مرگ و میر ناشی از کم شدن تراکم *Wolbachia* در دمای بالا در تلاقی ناسازگار بیانگر اثر تراکم بر شدت ناسازگاری القا شده در زنبور پارزیتوئید *H. hebetor* است (Nasehi *et al*., 2021). استرین آلوده‌کننده در این زنبور پارازیتوئید، حامل فاژ WO است که ژن‌های مسئول بروز ناسازگاری روی ژنوم این فاژ قرار گرفته است (Nasehi *et al*., 2021). دمای بالا با القای فاز لایتیک و با خروج ذرات فاژ، منجر به کشتن سلول‌های میزبان و کاهش در تراکم باکتری می‌شود که در نهایت، با کاهش شدت اثرات همراه است (Bordenstein *et al*., 2011).

به طور کلی در گونه‌های هاپلودیپلوئید ناسازگاری عموماً از نوع مرگ و میر ماده است و نوع توسعه به نر در مواردی همچون *N. vitripennis* به ندرت دیده می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003). نوع ناسازگاری سیتوپلاسمی درگونه‌های هاپلودیپلوئید نیاز به بررسی‌های بیشتر در این زمینه دارد. طی تکامل، در صورتی که باکتری در حال گسترش در میزبان باشد، ناسازگاری از نوع MD از بین می‌رود، زیرا با حذف نرهای آلوده و کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت، توانمندی و گسترش میزبان دچار اختلال می‌شود و در صورتی که باکتری در جمعیت میزبان در حال استقرار باشد، فشار تکاملی منجر به تغییر نوع CI از MD به FM می‌شود (Bordenstein *et al*., 2003).

حضور استرین CI باکتری *Wolbachia* در زنبورهای پارازیتوئید می‌تواند منجر به عدم موفقیت برنامه‌های کنترل بیولوژیک و یا اختلال در روند پرورش این زنبورها در انسکتاریوم‌ها شود. همچنین، در پرورش انبوه این زنبورها

باید وضعیت *Wolbachia* مشخص شود تا بر اساس آن رویکردهای مناسبی برای پرورش و تولید انبوه طراحی و اجرا شود. بنابراین، حضور و عدم حضور باکتری *Wolbachia* در پارازیتوئیدها می‌تواند کارایی زنبور را در جنبه‌های مختلف زیستی، فیزیولوژیکی و رفتاری تحت تاثیر قرار دهد. تعیین نوع ناسازگاری در زنبورهای پارازیتوئید می‌تواند مشخص کند میزبان و باکتری در چه مرحله‌ای از تکامل قرار گرفته‌اند. نتایج این پژوهش نشان داد ناسازگاری در زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* همچون سایر زنبورهای پارازیتوئید، از نوع مرگ و میر ماده (FM) است. به عبارتی در این زنبور پارازیتوئید، باکتری *Wolbachia* در حال استقرار در جمعیت میزبان است و فشار تکاملی منجر به ممانعت از توسعه جنین میزبان به نر می‌شود؛ زیرا باکتری در راستای پراکنش بیشتر خود به جنس ماده نیاز دارد و از طرفی افزایش جنس نر و کاهش تعداد ماده در جمعیت، منجر به اختلال در پویایی جمعیت میزبان می‌شود (Russell *et al*., 2018). بررسی نوع CI در این زنبور پارازیتوئید یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تکاملی است که نشان‌دهنده اهمیت بررسی برهمکنش میزبان-*Wolbachia* در طراحی و اجرا برنامه‌های کنترل بیولوژیک است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (INSF) در قالب طرح پژوهشی به شماره ۹۸۰۰۸۵۸۲ به انجام رسیده است.

References

Badran, F., Fathipour, Y., Bagheri, A., Attaran, M. and Reddy, G. V. 2020. Effects of prolonged mass rearing on life history traits of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **International Journal of Pest Management** 10.1080/09670874.2020.1830198

Bagheri, Z., Talebi, A. A., Asgari, S. and Mehrabadi, M. 2019a. *Wolbachia* induce cytoplasmic incompatibility and affect mate preference in *Habrobracon hebetor* to increase the chance of its transmission to the next generation. **Journal of Invertebrate Pathology** 163: 1-7.

Bagheri, Z., Talebi, A. A., Asgari, S. and Mehrabadi, M. 2019b. *Wolbachia* promote successful sex with siblings. **bioRxiv** 855635.

Bluher, S. E., Miller, S. E. and Sheehan, M. J. 2020. Fine-scale population structure but limited genetic differentiation in a cooperatively breeding paper wasp. **Genome Biology and Evolution** 12(5): 701-714.

Bonneau, M., Landmann, F., Labbe, P., Justy, F., Weill, M. and Sicard, M. 2018. The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of *cidB* diversity. **PLoS Pathogens** 14(10): e1007364.

Bordenstein, S. R., Uy, J. J. and Werren, J. H. 2003. Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia*. **Genetics** 164(1): 223-233.

Breeuwer, J. A. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestani*. **Heredity** 79: 41-47.

Charlesworth, D. and Willis, J. H. 2009. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews genetics**, 10(11): 783-796.

Gebiola, M., Giorgini, M., Kelly, S. E., Doremus, M. R., Ferree, P. M. and Hunter, M. S. 2017. Cytological analysis of cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* suggests convergent evolution with its distant cousin *Wolbachia*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 284(1862): 20171433.

Ghimire, M. N. 2008. Reproductive performance of the parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on various host species of Lepidoptera. Oklahoma State University.

Holden, P. R., Jones, P. and Brookfield, J. F. 1993. Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. **Genetics Research** 62(1): 23-29.

Hunter, M. S., Perlman, S. J. and Kelly, S. E. 2003. A bacterial symbiont in the bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 270: 2185-2190.

Hurst, G. D., Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G., Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R. and Majerus, M. E. 1999. Male–killing

Wolbachia in two species of insect. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 266: 735-740.

Karamipour, N., Mehrabadi, M. and Fathipour, Y. 2016. Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). **Scientific Reports** 6: 33168.

Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., Sarah R. Bordenstein, and Bordenstein, S. R. 2021. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. Cell Host & Microbe. 29(6):879-893

Kent, B. N, and Bordenstein, S. R. 2010. Phage WO of *Wolbachia*: lambda of the endosymbiont world. **Trends in Microbiology** 18(4): 173-181.

King, J. G., Souto-Maior, C., Sartori, L. M., Maciel-de-Freitas, R. and Gomes, M. G. M. 2018. Variation in *Wolbachia* effects on *Aedes* mosquitoes as a determinant of invasiveness and vectorial capacity. **Nature Communications** 9(1): 1-8.

Landmann, F., Orsi, G. A., Loppin, B. and Sullivan, W. 2009. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. **PLoS Pathogens** 5: e1000343.

Laven, H. 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. **Evolution** 5: 370-375.

Laven, H. 1959. Speciation in mosquitoes speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens*-complex. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 166-173.

LePage, D. P., Metcalf, J. A., Bordenstein, S. R., On, J., Perlmutter, J. I., Shropshire, J. D., Layton, E. M., Funkhouser-Jones, L. J., Beckmann, J. F. and Bordenstein, S. R. 2017. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. **Nature** 543: 243-247.

Moran, N. A., McCutcheon, J. P. and Nakabachi, A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics** 42: 165-190.

Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M, and Vavre, F. 2005. Multiple infections and diversity of cytoplasmic incompatibility in a haplodiploid species. **Heredity**, 94(2): 187-192.

Narita, S., Nomura, M., and Kageyama, D. 2007. Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly Eurema hecabe: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. **FEMS Microbiology Ecology** 61(2): 235-245.

Nasehi, S. F., Fathipour, Y., Asgari, S., and Mehrabadi, M. 2021. Environmental Temperature, but Not Male Age, Affects *Wolbachia* and Prophage WO Thereby Modulating Cytoplasmic Incompatibility in the Parasitoid Wasp, *Habrobracon Hebetor*. **Microbial Ecology**. 10.1007/s00248-021-01768-x

O'Neill, S. L .and Karr, T. L. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. **Nature** 348: 178-180.

O'Neill, S. L., Giordan, R., Colbert, A., Karr, T. L. and Robertson, H. M. 1992. 16s rrna phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 89: 2699-2702.

Ross, P. A., Wiwatanaratanabutr, I., Axford, J. K., White, V. L., Endersby-Harshman, N. M. and Hoffmann, A. A. 2017. *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* differ markedly in their response to cyclical heat stress. **PLoS Pathogens** 13(1): e1006006.

Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. and Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 250: 91-98.

Russell, J. E., Nunney, L., Saum, M. and Stouthamer, R. 2018. Host and symbiont genetic contributions to fitness in a *Trichogramma–Wolbachia* symbiosis. **PeerJ** 6: e4655.

Shropshire, J. D., Leigh, B. and Bordenstein, S. R. 2020. Symbiont-mediated cytoplasmic incompatibility: what have we learned in 50 years? **Elife** 9: e61989.

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

Tram, U., Ferree, P. M. and Sullivan, W. 2003. Identification of *Wolbachia*–host interacting factors through cytological analysis. **Microbes and Infection** 5(11): 999-1011.

Vavre, F., Dedeine, F., Quillon, M., Fouillet, P., Fleury, F. and Boulétreau, M. 2001. Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. **Evolution** 55(8): 1710-1714.

Vavre, F., Fleury, F., Varaldi, J., Fouillet, P. and Bouleatreau, M. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. **Evolution** 54(1): 191-200.

Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z. and Welch, J. J. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 282(1807): 20150249.

Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology** 6(10): 741-751.

Yen, J. H. and Barr, A. R. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **Nature** 232: 657-658.

Plant Pest Research
2021- 11 (2): 53-66

Research paper

Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in *Habrobracon hebetor* (Hym.: Braconidae)

S. F. Nasehi, Y. Fathipour and M. Mehrabadi*
Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: July 31, 2021- Accepted: September 19, 2021)

Abstract

Cytoplasmic incompatibility (CI) is the most common reproduction manipulation induced by intracellular bacteria, *Wolbachia* which occurs when infected males mate with an uninfected female. The result of incompatibility in diploid species is embryonic death and in haplodiploid species, CI occurs in two ways: male development (MD) and female mortality (FM). The parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor* infected with a *Wolbachia*- CI strain. In the present study, after removal of *Wolbachia* with antibiotic, the incompatibility type was determined by comparing the number of offspring, the number of male progeny and the mortality rate in different developmental stages in the compatible and incompatible crosses of *H. hebetor*. Also, the effect of temperature on CI intensity was investigated by comparing the number of offspring at 25, 30 and 35 °C in the compatible and incompatible crosses. The results showed that the number of offspring in the incompatible cross was less than the compatible cross and there was no difference in the number of produced males. Moreover, the highest mortality was observed in the egg hatching stage. Finally, high temperatures increased the number of offspring and decreased the severity of CI in the incompatible cross. Together, it can be concluded that CI type is female mortality in these parasitoid wasps. These results shed more light on the mechanisms underlying *Wolbachia*- host interaction.

Key words: *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility, female mortality, parasitoid wasp

* Corresponding author: m.mehrabadi@modares.ac.ir