



Endosymbiont Microorganisms in Rusty Grain Beetle *Cryptolestes ferrugineus* (L.) Populations[#]

Hüseyin Ünal^{1,a}, Erhan Koçak^{1,b,*}

¹Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, 32000 Isparta, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO

[#]This study was presented as an oral presentation at the 13th National, 1th International Field Crops Conference (Antalya, TABKON 2019)

Research Article

Received : 22/11/2019

Accepted : 09/12/2019

Keywords:

Cryptolestes ferrugineus

Wolbachia

Rickettsia

Spiroplasma

Endosymbionts

ABSTRACT

Bacterias are the most important members of insect microbial flora. These microorganisms create important food for insects, contribute to nutrient digestion, synthesize useful vitamins and enzymes, bind nitrogen, provide resistance to insecticides, produce pheromones and contribute to insect life in order to compete with insect pathogens; also there are pathogenic bacteria which kill, pacify and control them. More effective, new and environmentally-conscious methods are required to control the pests. First of all, after determining the endosymbiont bacteria composition of pest insects in our country, new control strategies can be made possible to do experiments by considering the characteristics of these bacteria species. Therefore, 10 populations of *C. ferrugineus* were collected from cereal storages in Adana, Konya, Izmir, Samsun, and Istanbul provinces in order to investigate the presence of secondary endosymbionts in *Cryptolestes ferrugineus*. Presence of *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* as endosymbiont microorganisms have been determined by applying synthetic primers and PCR method for the first time in our country. Totally, there were 10 populations and three of them have *Wolbachia*, six of them have *Rickettsia* and one of them has *Spiroplasma*. Seven of the total population in Turkey (%70) were found to be infected with at least one endosymbiont. This study is also the first study in the world that show that *C. ferrugineus* is infected with endosymbionts *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma*.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp2): 93-96, 2019

Küçük Kıрма Biti *Cryptolestes ferrugineus* (L.) Popülasyonlarında Endosimbiyont Mikroorganizmaların Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 22/11/2019

Kabul : 09/12/2019

Anahtar Kelimeler:

Cryptolestes ferrugineus

Wolbachia

Rickettsia

Spiroplasma

Endosimbiyont

ÖZ

Böcek mikrobiyal florasının en önemli üyelerini bakteriler oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar böcekler için uygun gıda oluşturmak, besin sindirime katkıda bulunmak, faydalı vitamin ve enzim sentezlemek, azot bağlamak, insektisitlere direnç sağlamak, feromon üretmek ve böcek patojenleri ile rekabet etmek amacıyla böceklerin yaşamına önemli katkılar sağlamaları yanında böcekleri öldüren, hastalandıran ve kontrol eden bakteriler de bulunmaktadır. Zararlılar ile mücadelede yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili mücadele yöntemleri gerekmektedir. Öncelikle ülkemizde bulunan zararlı böcek türlerinin, endosimbiyont bakteri kompozisyonları belirlendikten sonra yapılacak deneyler için yeni bir mücadele stratejisini mümkün kılabilir. Buradan hareketle ülkemiz depolarında yaygın olarak bulunan sekonder zararlı, Küçük Kıрма Biti *Cryptolestes ferrugineus* (L.) bünyesindeki endosimbiyont varlığının araştırılması amacıyla Adana, Konya, İzmir, Samsun ve İstanbul illerindeki hububat depolarından 10 adet *C. ferrugineus* popülasyonu toplanmıştır. Söz konusu böcek türünde ülkemizde ilk kez endosimbiyont mikroorganizmalardan *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* varlıkları, sentetik primerler ve PCR metodu uygulanarak belirlenmiştir. Toplam 10 popülasyondan üçünde *Wolbachia*, altısında *Rickettsia* ve bir popülasyonda ise *Spiroplasma* belirlenmiştir. Türkiye genelinde 10 popülasyondan yedisinin (%70) bir endosimbiyontla bulaşık olduğu görülmüştür. Bu çalışma, *C. ferrugineus*'un endosimbiyontlar *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* ile enfekteli olduğunu gösteren dünyadaki ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

^a erhankocak@isparta.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-9882-6569> | h.unal@gokhantarim.com.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-4569-8206>



Giriş

Ülkemizde görülen dört mevsimin etkisi doğrultusunda oluşan iklim özellikleri ve üretim çeşitliliği çok sayıda ürün zararlısının oluşumu ile karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu zararlılar depolanmış ürünlerde hem doğrudan hem de dolaylı olarak birçok alanda zarar vermektedir. Karşılaştığımız zararlar ise üründe hedeflenen verimin elde edilememesi, tohum özelliğinin etkisini yitirmesi, üründe ağırlık kaybı yaşanması ve besin değerlerinin azalması şeklinde kayıplar yaşanmasına neden olmaktadır (Boxall, 2001). Ürünler üzerinde oluşan tüm bu olumsuz etkilerin ortadan kalkması için öncelikli olan şey zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altına alınmasıdır.

Küçük kırmızı biti (*Cryptolestes ferrugineus* L.), erginleri yumurtalarını tanenin içine bırakarak depolanmış hububatın embriyo ve endospermilerine zarar vermektedirler. Yoğun bulaşma durumlarında ise olgun larva, pupa olmadan önce çevresindeki gıda maddelerini salgıladığı maddelerle vücuduna yapııştırarak kendisine pupa oluşumu için ortam oluştururken hububatta ısınma ve bozulmalara neden olmaktadır. Bununla birlikte un, kepek, kakao, baharat, kahve, bisküvi, bulgur ve makarna gibi işlenmiş un mamullerinde ise beslenme ve salgıları nedeniyle zarar vermektedir. Vermiş olduğu zararlar ürünlerde ağırlık kaybı, besin değerinin düşmesi ve bozulma gibi ekonomik değerin azalmasına etki etmektedir (Zawalska ve ark., 2016).

Böcek mikrobiyal florasının en önemli üyelerini bakteriler oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar böceklerde besin sindirimine yardımcı olma, faydalı enzimler üretme, vitaminleri sentezleme, insektisitlere direnç kazanma, azot bağlama, feromon üretme ve böcek patojenleri ile rekabet etme suretiyle böceklerin yaşamına önemli katkılar sağlamaktadırlar. Fakat bütün bu faydalı etkilerinin yanında böcekleri öldüren, hastalandıran ve kontrol eden bakteriler de yer almaktadır (Stouthamer ve ark., 1999). Özellikle tarımsal ürünlerde zararlı olan böceklerin endosimbiyontlar ile kurdukları ilişkinin tam olarak aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Çünkü zararlılar ile mücadelede yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda aynı tür böceğin farklı bölge veya ülke popülasyonlarında, endosimbiyont kompozisyonu farklılık gösterebilmektedir. Depolanmış ürün zararlısı olan böcek türlerinde endosimbiyotik bakteri kompozisyonları incelendiğinde başta *Wolbachia* olmak üzere *Rickettsia* ve

Spiroplasma varlığı belirlenmiştir (Gündüz ve Douglas, 2009).

Wolbachia arthropodların %80'ine yakın bir kısmında dişileşme (feminizasyon), erkek bireylerin ölümü, sitoplazmik uyumsuzluk ve partenogenik bireylerde telytokinin artışı gibi bir takım üreme farklılıklarına yol açarak popülasyon yoğunluğunun azalmasına sebep olmaktadır (Breeuwer ve ark., 1992; Stouthamer ve ark., 1999). *Rickettsia* daha çok Diptera takımında bulunmakla birlikte birçok farklı konukçu değiştirme özelliğine sahiptir. Ayrıca böceklerin bakteriomları, yumurtalıkları, testisleri ve tükrük bezlerinde lokalize olduklarını belirlemişlerdir. Flüger ve ark., (2012), yaptıkları çalışmada enfekteli bir böceğin beslenmesi sırasında *Rickettsia*'nın bitkiye transfer olduğu ve floem içinde hareket edip aynı bitkiden beslenen başka bir böceğe aktarıldığı gözlemlenmiştir. *Spiroplasma* ise spiral şekilli hücre duvarı olmayan hücrelerden oluşmaktadır. Sarmal yapıda hareketli ve gram-pozitif bir bakteri türüdür. *Spiroplasma* endoselüler ve ekstraselüler olarak çeşitli böcek türleri ile etkileşime girer. Depo zararlısı böceklerin bağırsağında veya hemolimfinde bulunurlar. *Wolbachia* gibi hem çeşitli konukçu değiştirme gibi özelliklere sahip hem de böceklerde anneden yavruya aktarılırlar (Martin ve ark., 2013).

Son 15 yılda endosimbiyont bakterilerin konukçularında meydana getirdikleri yaşamsal olayların açığa çıkarılmasıyla birlikte bu bakterilerin tanı ve karakterizasyon çalışmalarında artış meydana gelmiştir. Özellikle, sekonder simbiyont olan bakterilerin bu önemli özelliklerinden faydalanarak yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili zararlı böcek mücadelesi yapılabilir. Ancak, öncelikle ülkemizde bulunan zararlı böcek türlerinin, nasıl bir endosimbiyont bakteri kompozisyonuna sahip olduğu belirlendikten sonra; bu bakteri türlerinin özellikleri göz önünde bulundurularak, yapılacak deneyler yeni bir mücadele stratejisini mümkün kılabilir.

Materyal ve Yöntem

Ülkemizde Akdeniz, Ege, Marmara ve İç Anadolu Bölgeleri'nden Adana, İstanbul, İzmir, Konya ve Samsun illerinde bulunan 10 farklı hububat deposundan örnekler toplanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1 *Cryptolestes ferrugineus* L. popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar

Table 1 Locations of *Cryptolestes ferrugineus* L. populations

Popülasyon	Toplandığı yer / Depo Tipi	Koordinat
Adana K2	Ceyhan TMO	N37°1'7.082" E5°48'30.157"
Samsun İ1	Merkez TMO	N41°18'8.844" E36°19'56.73"
Samsun İ2	Canik Özel Ulusoy Un	N41°16'46.931" E36°20'9.84"
Samsun İ5	Bafra Özel Bereket Un	N41°36'30.089" E35°39'0.409"
Konya E4	Alibeyhöyüğü Çiftçi Depo	N37°31'57.148" E32°39'42.659"
Konya 10	İlgin TMO	N38°17'25.004" E31°54'30.704"
Konya E12	Yunak TMO	N38°48'36.018" E31°43'55.437"
İzmir A3	Merkez Özel Ege Un	N38°25'35.116" E27°9'27.316"
İzmir A6	İşıkkent TMO	N38°26'26.551" E27°9'6.027"
İstanbul R1	Büyükçekmece Özel Eriş Un	N41°4'13.427" E30°9'31.499"

Uygun besin ortamı ve koşullar sağlanarak bireyler laboratuvara getirilmiştir. Her popülasyondan altı adet ergin birey rastgele seçilerek -80°C'de DNA'ları zarar görmeyecek şekilde toplam 60 birey muhafazaya alınmıştır. Bu bireylerin DNA ekstraksiyonları ticari kit protokolüne uyularak yapılmıştır. Ekstraksiyondan sonra elde edilen DNA'lar kalite ve miktar analizine (Nanodrop) tabii tutulmuş olup böcek türünün oldukça küçük bir yapıda olması nedeniyle yaklaşık olarak 1,7 ile 1,9 arasında değerler belirlenmiştir. Çalışmada Kademeli sıcaklık düşürme per (touchdown per protokolü) kullanılmıştır (Çizelge 2).

Literatür taraması sonucunda en yaygın görülen *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* endosimbiont bakterilerinin primer dizileri incelenip uygun olan primerler HPLC saflıkta sentezletirilmiştir (Çizelge 3). HPLC saflıkta kurutulmuş olarak gönderilen primerler 100µM stok haline getirilmek için belirtilen miktarda (508-675µL) nuclease-free water ile çözdürülmüştür. Çözdürülen primerler -20°C'de muhafazaya alınmıştır. PCR uygulaması için kullanılan protokol Çizelge 4'te verilmiştir.

Sonuç ve Tartışma

Türkiye'de farklı bölgelerden toplanmış ve fosfin direnç durumları bilinen toplam 10 farklı *C. ferrugineus* popülasyonunun her birinden altı ergin bireyin analizi sonucunda *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* enfeksiyonları belirlenmiştir. *C. ferrugineus* popülasyonlarındaki endosimbiontların bulunma durumları Çizelge 5'te gösterilmiştir.

Samsun popülasyonlarında toplam 18 bireyde 3 adet *Wolbachia*, 2 adet *Rickettsia* ve 1 adet *Spiroplasma*; Konya popülasyonlarında toplam 18 bireyde 1 adet *Wolbachia* ve 4 adet *Rickettsia*; İstanbul popülasyonunda 6 bireyde 1 adet *Rickettsia* enfeksiyonu belirlenmişken Adana ve İzmir popülasyonlarında ise sözü geçen endosimbiontlara rastlanamamıştır. Elde edilen verilere göre 10 farklı popülasyondan üç popülasyonda *Wolbachia*, 6 popülasyonda *Rickettsia* ve 1 popülasyonda *Spiroplasma* belirlenmiştir.

Türkiye genelinde 10 adet *C. ferrugineus* popülasyonundan yedisinde (%70) en az bir endosimbiont bulaşması tespit edilmiştir. Toplam popülasyondaki enfeksiyon oranları *Wolbachia* için %6,7, *Rickettsia* için %11,7 ve *Spiroplasma* için ise sadece %1,6 olarak belirlenmiştir.

Günümüze kadar depo zararlıları ve endosimbiont bakteriler arasındaki ilişki araştırılmış olsa da *C. ferrugineus* bünyesinde herhangi bir endosimbiont bakteriyeye rastlanamamıştır. Li, ve ark. (2015), *Wolbachia*'nın konukçunun üremesini ve biyolojisini etkileyebildiğinden zararlı böcek popülasyonlarını kontrol etmek için içerisinde *C. ferrugineus* (Kanada), *C. turcicus* (Kanada) ve *C. pusillus* (USA) türlerinin de bulunduğu 38 farklı türde (16 ülkeden 88 farklı popülasyon) depo zararlısını taramış olup *Cryptolestes* spp.'de *Wolbachia*'ya rastlayamamıştır. Bu çalışmaya benzer olarak, Kageyama ve ark., (2010) Coleoptera takımına ait 38 türden 59 popülasyonda *Wolbachia* varlığını araştırmış olup 13 türden 18 popülasyonun *Wolbachia* ile enfekteli olduğunu ortaya koymuştur. Ancak *C. pusillus* türünde herhangi bir

endosimbionta rastlanmamıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise *Wolbachia*, *Spiroplasma* ve *Rickettsia*'ya rastlanmıştır.

Çizelge 2 Touchdown pcr analizi için cihaz ayarlaması
Table 2 Device setup for touchdown PCR analysis

Başlangıç denatürasyonu: 94°C 3dk
Denatürasyon 94°C 1dk
Bağlanma 60°C 1dk (11x: -1°C) (60°C-50°C)
Uzatma 72°C 1 dk
11x
Denatürasyon 94°C 1dk
Bağlanma 55°C 1dk
Uzatma 72°C 1 dk
25x
Son uzatma 72°C 10 dk
4°C ∞

Çizelge 3 *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* primer bilgileri

Table 3 *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* primer informations

Bakteri suşları	Primerler
<i>Wolbachia</i> F; Tm:58°C	5'TGGTCCAATAAGTGAAGAACTAGCTA-3'
<i>Wolbachia</i> R; Tm:59°C	5'-AAAAATTAACCGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3'
<i>Rickettsia</i> F; Tm:51°C	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'
<i>Rickettsia</i> R; Tm:52°C	5'-CATCCATCAGCGATAAATCTTTC-3'
<i>Spiroplasma</i> F; Tm:51°C	5'-GCGCAGACGGTTTAAACAAG-3'
<i>Spiroplasma</i> R; Tm:53°C	5'-TCCGCCACTGGTGTTCCTC-3'

Çizelge 4 PCR örneklerinin hazırlanması

Table 4 Preparation of PCR samples

1	25µl Taq PCR Master Mix (2.5 units Taq DNA Polymerase, 1x PCR Buffer, 200µM of each dNTP, 1,5mM MgCl2)
2	5µl 10x Primer Mix (2µM of each primer)(2,5µl F-2,5µl R)
3	15µl RNase-free water
4	5µl Template DNA
	Son hacim; 50µl

Çizelge 5 *Cryptolestes ferrugineus* L. popülasyonlarında belirlenen endosimbiontlar

Table 5 Endosymbionts which are identified in *Cryptolestes ferrugineus* populations

Popülasyonlar	<i>Wolbachia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Spiroplasma</i>
Adana K2	-	-	-
Samsun İ2	2	1	-
Samsun İ1	-	-	1
Samsun İ5	1	1	-
Konya E12	-	2	-
Konya E4	1	1	-
Konya E10	-	1	-
İzmir A3	-	-	-
İzmir A6	-	-	-
İstanbul R1	-	1	-

Bu araştırma, *C. ferrugineus*'un endosimbiyontlar *Wolbachia*, *Spiroplasma* ve *Rickettsia* ile enfekteli olduğunu gösteren dünyadaki ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Bu tür çalışmalar depolanabilir ürünlerdeki zararı minimuma indirmek ve zararlı popülasyonları üzerindeki endosimbiyont varlığını belirleyerek endosimbiyontlar aracılığıyla popülasyonu kontrol altında tutabilmek adına büyük önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Boxall RA. 2001. Post-harvest losses to insect-a world overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 48: 137-152.
- Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Barns SM, Pelletier DA, Weisburg WG, Werren JH. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 1(1): 25-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00074.x>
- Fluger AC, Inbar M, Daube NM, Katzir N, Portnoy V, Belausov E., Hunter MS, Fein EZ. 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proc. R. Soc. B* 279, 1791-1796.
- Gündüz AE, Douglas AE. 2009. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 987-991.
- Kageyama D, Narita S, Imamura T, Miyanoshita A. 2010. Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pest and their parasitoids. *Journal of Stored Products Research*, 46: 13-19.
- Li YY, Fields PG, Pang BP, Coghlin PC, Floate KD. 2015. Prevalence and diversity of *Wolbachia* bacteria infecting insect pests of stored products. *Stored Products Research*, 62: 93-100.
- Martin J, Chong T, Ferree PM. 2013. Male killing *Spiroplasma* preferentially disrupts neural development in the *Drosophila melanogaster* embryo. *PLoS ONE* 8(11): 1-8.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53(1): 71-102.
- Zawalska JJ, Asman M, Klys M, Solarz K. 2016. Prevalence of sensitization to extracts from particular life stages of the saw-toothed grain beetle (*Oryzaephilus surinamensis*) in citizens of selected suburban areas of Southern Poland. *Journal of Stored Products Research*, 69: 252-256.