



Endosymbiotic Microorganisms in Rice Weevil *Sitophilus oryzae* (L.) Populations[#]

Mehmet Oğuz Yaman^{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:

Sitophilus oryzae
Wolbachia
Rickettsia
Spiroplasma
Endosymbiont bacteria

ABSTRACT

Symbiotic bacteria in eukaryotic organisms can show very different effects in the organism in which they are host. The rapid advances in molecular biology and functional genome science studies are of great importance especially in elucidating the relationship between insects harmful to agricultural products and endosymbionts. One of the important pests in agricultural products is Rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.). Within the scope of this study, the presence of endosymbiont microorganisms such as *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* in *S. oryzae* populations in Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa and İzmir provinces were investigated. *Rickettsia* was detected in five out of six populations and the percentage of contamination was found to be 55.5% (20 out of 36 individuals representing populations). *Wolbachia* was detected in four of the six populations and the percentage of contamination was found to be 22.2% (8 of 36 individuals representing the populations). *Spiroplasma* was detected in three out of six populations and the percentage of contamination was 8.3% (3 out of 36 individuals representing populations). The importance of this study is that *Spiroplasma* has been determined within *S. oryzae* for the first time.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp2): 82-85, 2019

Pirinç Biti *Sitophilus oryzae* (L.) Popülasyonlarında Endosimbiyont Mikroorganizmaların Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 22/11/2019

Kabul : 09/12/2019

Anahtar Kelimeler:

Sitophilus oryzae
Wolbachia
Rickettsia
Spiroplasma
Endosimbiyont

ÖZ

Ökaryot organizmalardaki simbiyotik bakteriler konukçu organizmalarda çok değişik etkiler gösterebilmektedirler. Moleküler biyoloji ve fonksiyonel genom bilim çalışmalarındaki hızlı ilerlemeler özellikle tarımsal ürünlerde zararlı olan böceklerin endosimbiyontlar ile kurdukları ilişkisinin tam olarak aydınlatılmasında büyük önem arz etmektedir. Tarımsal ürünlerdeki önemli zararlılardan birisi de Pirinç biti *Sitophilus oryzae* (L.)'dir. Çalışma kapsamında Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa ve İzmir illerinden *S. oryzae* popülasyonlarında endosimbiyont mikroorganizmalardan *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* varlıkları incelenmiştir. *Rickettsia* altı popülasyonun beşinde saptanmış ve enfeksiyon yüzdesinin %55,5 olduğu (popülasyonları temsil eden 36 bireyin 20'sinde) belirlenmiştir. *Wolbachia* altı popülasyonun dördünde saptanmış ve enfeksiyon yüzdesinin %22,2 olduğu (popülasyonları temsil eden 36 bireyin 8'inde) belirlenmiştir. *Spiroplasma* ise altı popülasyondan üçünde saptanmış olup enfeksiyon yüzdesi %8,3 olarak (popülasyonları temsil eden 36 bireyin 3'ünde) belirlenmiştir. Bu çalışmanın önemi, *Spiroplasma*'nın, ilk kez *S. oryzae*'da tespit edilmiş olmasıdır.

^a m.oguz.yaman@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-7347-4034> | erhankocak@isparta.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0002-9882-6569>



Giriş

Böcekler, içinde yaşadıkları habitatların çeşitliliği, bolluğu ve tür zenginliğine yansıyan, dünyadaki en çeşitli ve başarılı hayvan grubudurlar. Bunlardan birisi olan *Sitophilus oryzae* (L.), dünyada depolanmış tahıllarda nicelik kaybına neden olan en tahrip edici haşeresidir. Ayrıca gömlek kalıntıları, pislikleri ve salgıladıkları ağ maddeleri nedeniyle, üründe nitelik kayıplarına ve de yoğun bulaşmalarda ürünün küflenmesine, kızılaşmasına ve kokuşmasına neden olurlar (Zawalska ve ark., 2016).

Simbiyot bakteriler ise çok hücreli canlıları kolaylıkla işgal edip birlikte yaşama yeteneği geliştirebilmektedirler (Ratzka ve ark., 2012). Bakteriyel endosimbiyotların böceklerde beslenmenin iyileştirilmesi (Zientz ve ark., 2004), termal tolerans (Dunbar ve ark., 2007) veya artmış patojen/parazitoit direnci (Kaltenpoth, 2009) gibi çeşitli sağlık avantajları sağladığı gösterilmiştir. Chen ve ark. (2012)'ne göre oosit üretimi için *Wolbachia* gereklidir. Heddi ve ark. (2001) *Wolbachia*'nın *S. oryzae* üzerinde horizontal ve vertikal olarak vücut hücreleri boyunca aktarıldığı ve konukçusunun fizyolojisini etkilemediğini ancak üremeyi değiştirdiğini belirtmiştir. Vigneron ve ark. (2012) ise simbiyotik canlıların patojenlere karşı mücadele ederken böceğin yaşam standartlarını düşürdüğünü ve konukçu bağımsızlığı üzerine yeni perspektiflerin bulunduğunu ortaya koyarak, endosimbiyotlar ve patojenler sayesinde böcek direncinin azaldığı mücadele yöntemlerinin artmakta olduğunu bildirmişlerdir.

Özellikle tarımsal ürünlerde zararlı olan böceklerin endosimbiyotlar ile kurdukları ilişkinin tam olarak aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Çünkü zararlılar ile mücadelede yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili yöntemler gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiyot kompozisyonu farklılaşmaktadır. Aynı tür böceğin farklı bölge ve/veya ülke popülasyonlarında, endosimbiyot kompozisyonun farklılaştığı da bilinmektedir (Su ve ark., 2013). Depolanmış ürün zararlı türler ile yapılan, endosimbiyotik bakteri analizleri incelendiğinde ise yaygın olarak *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* tanısı yapılmıştır (Gündüz ve Douglas, 2009). Son 10 yılda endosimbiyot bakterilerin konukçularında meydana getirdikleri yaşamsal olayların açığa çıkarılmasıyla birlikte bu bakterilerin tanı ve karakterizasyon çalışmalarında artış meydana gelmiştir. Özellikle sekonder endosimbiyot 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 endosimbiyot bakteri kompozisyonuna sahip olduğu belirlendikten sonra; bu bakteri türlerinin özellikleri göz önünde bulundurulması yeni bir mücadele stratejisini mümkün kılabilir.

Bu çalışmada ülkemizdeki pirinç biti popülasyonlarında endosimbiyot bakterilerden *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* mevcudiyetleri ortaya konulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Ülkemizde Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa illerinden birer ve İzmir'den iki farklı popülasyon olmak üzere toplam altı adet *S. oryzae* popülasyonu elde toplanmıştır (Çizelge 1). Her bir popülasyondan rastgele 6 tane canlı ergin birey seçilmiş ve toplam 36 bireyin DNA

ekstraksiyonu ticari kit protokolüne uyularak yapılmıştır. Touch down PCR analizi ise Çizelge 2'de görüldüğü biçimde yapılmıştır. Endosimbiyotları belirlemede kullanılan primerler ise Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 1 *Sitophilus oryzae* L. popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar

Table 1 Locations where *Sitophilus oryzae* populations are collected

Popülasyon	Depo
Adana - K5	TMO
Konya - E8	TMO
Diyarbakır - C4	ÖZEL (Özayıldızlar)
Manisa - A2	ÖZEL (Nur Un)
İzmir - A3	ÖZEL (Ege Un)
İzmir - A6	TMO

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 Primer informations of *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Spiroplasma*

Bakteri	Primerler
<i>Wolbachia</i> F	5'TGGTCCAATAAGTGAAGAACTAGCTA-3'
<i>Wolbachia</i> R	5'-AAAAATTAACCGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3'
<i>Rickettsia</i> F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'
<i>Rickettsia</i> R	5'-CATCCATCAGCGATAAATCTTTC-3'
<i>Spiroplasma</i> F	5'-CGCGACGCGTTTAAACAAG-3'
<i>Spiroplasma</i> R	5'-TCCGCCACTGGTGTCTC-3'

Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada Adana, Konya, Diyarbakır, Manisa, İzmir illerinden toplanan *S. oryzae* popülasyonlarında sekonder endosimbiyot olan *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* moleküler yöntemler kullanılarak taranmıştır. Türkiye'deki 6 farklı ildeki özel ve TMO hububat depolardaki *S. oryzae* popülasyonlarında her üç endosimbiyotda farklı enfeksiyon oranlarında olduğu tespit edilmiştir.

Üzerinde çalışılan Adana, Diyarbakır, Konya, Manisa ve İzmir illerinden toplanmış altı adet *S. oryzae* popülasyonunun toplam 36 bireyinde *Wolbachia*, *Rickettsia* ve *Spiroplasma* türünden en az bir tanesinin enfeksiyon oranının %61 olduğu gözlemlenmiştir. Toplam enfeksiyon oranının %22,2'sini *Wolbachia*, %55,5'ini *Rickettsia*, %8,3'ünü *Spiroplasma* oluşturmaktadır. *Spiroplasma* enfeksiyonu *S. oryzae*'de ilk defa bu çalışma ile tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4 Araştırmada popülasyonlara göre bulunan türler ve sayıları

Table 4 Species and number of species found in the study

Popülasyon	<i>Wolbachia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Spiroplasma</i>
Adana - K5	0	4	0
Konya - E8	3	6	1
Diyarbakır - C4	2	4	0
Manisa - A2	0	0	1
İzmir - A3	2	2	1
İzmir - A6	1	4	0

En yüksek enfeksiyon oranı E8 popülasyonunda tespit edilirken, en düşük bulaşma oranı A2 popülasyonunda tespit edilmiştir. Altı popülasyonu temsil eden toplam 36 bireyin; %44,4'ünde tekli enfeksiyon saptanmış olup, tekli enfeksiyonların %87,5'ini *Rickettsia* enfeksiyonu, %6,25'ini *Wolbachia* enfeksiyonu, %6,25'ini de *Spiroplasma* enfeksiyonu oluşturmaktadır. Toplam 36 bireyin; %11,1'inde ikili bulaş saptanmış olup ikili enfeksiyonların %100'ünü *Wolbachia-Rickettsia* ikili enfeksiyonu oluşturmaktadır. Toplam 36 bireyin; %5,6'ında ise üçlü (*Wolbachia-Rickettsia-Spiroplasma*) enfeksiyon tespit edilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Türkmen ve Koçak (2017) Ege (İzmir, Manisa), İç Anadolu (Ankara, Konya), Karadeniz (Samsun), Güneydoğu Anadolu (Diyarbakır, Şanlıurfa) ve Akdeniz (Adana) bölgeleri olmak üzere 12 farklı *S. oryzae* popülasyonunda *Wolbachia* enfeksiyonunun %98,3 olduğunu bildirmiştir. Tunçbilek ve ark. (2015), Antalya popülasyonları olan *S. granarius*, *S. zeamais* ve parazitoid *Lariophagus distinguendus* için, simbiyot olarak yaşayan *Wolbachia* enfeksiyonunu taramış ve *S. granarius*'un tüm bireylerinde *Wolbachia* ve *Arsenophonus* enfeksiyonunu belirlenmiş, parazitoid *L. distinguendus*'ta ise *Wolbachia* ve *Spiroplasma* enfeksiyonunu belirlemiştir. Bu sebeple *S. granarius* ile parazitoid *L. distinguendus* arasındaki ilişkinin araştırılması gerektiğini bildirmiştir. *S. zeamais* örneğinde ise hiçbir enfeksiyon belirlenmediğini bildirmişlerdir.

S. oryzae popülasyonlarında *Wolbachia* birçok çalışmada belirlenmiş ve çeşitli yönleri ile ele alınmıştır. Werren ve ark., (1995)'de yapmış oldukları çalışmada aralarında *S. oryzae*'nin de bulunduğu 31 farklı böcek türünde 38 farklı *Wolbachia* suşunu tarayarak filogenetik sınıflandırma yapmışlardır. Heddi ve ark. (1999) ve (2001)'de yaptıkları çalışmalarında Guadeloupe, Çin, Australya, Tunus ve Haiti'den toplanan *S. oryzae* popülasyonlarında *Wolbachia* bulmuştur. Ayrıca, *Wolbachia*'nın üreme hücrelerinde daha yüksek yoğunlukta olduğunu diğer hücrelerde ise yoğunluğun düşük olduğunu belirlemişlerdir. Fein ve Perlman (2004)'te 7 böcek takımı 99 türde *Wolbachia* taramış ve bu böcekler arasında yer alan *S. oryzae*'de yine *Wolbachia*'ı saptamıştır. On bir farklı böcek türünde *Wolbachia* varlığı ve çeşitliliğini araştırılan bir çalışmada, *S. oryzae*'nin *Wolbachia wSito* suşu saptanmış ve supergroup B olduğu belirlenmiştir (Henri ve Mouton, 2011). Carvalho ve ark., (2014) çalışmalarında *S. oryzae* ve *S. zeamais* horizontal *Wolbachia* geçişi olduğunu belirtmişlerdir.

Spiroplasma, *S. oryzae*'de dünyada ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Özetlemek gerekirse; ülkemizdeki

S. oryzae popülasyonları arasında endosimbiyot varlığı açısından dikkate değer farklılıklar olduğu görülmüştür.

Endosimbiyot bakterilerin, böceklerin üreme, beslenme, vücut sağlığı ve insektisit detoksifikasyonu gibi önemli yaşamsal fonksiyonlarına pozitif ya da negatif katkı sağladığı bilinmektedir. Endosimbiyot bakteri enfeksiyonunun tekli, ikili ya da çoklu olması da böcekteki yaşamsal fonksiyonları farklı olarak etkiyebilmektedir (Goodacre ve ark., 2015).

Türkiye'de depolanmış ürün zararlıları ile mücadelede kimyasal yöntemlerin etkin halde kullanıldığı bilinmektedir. Fakat böcekler tarafından kimyasallara karşı geliştirilen direnç ise mücadelenin eksik ya da uygunsuz yapıldığının bir göstergesi olabilir ve bu durum kimyasal mücadelenin efektif olmasını engellemektedir. Kimyasallara karşı böcekler tarafından geliştirilen direncin olumsuz etkilerinden kaçınmak için farklı mücadele yöntemleri denenmektedir. Endosimbiyotların böcek fizyolojisi üzerine etkileri ise endosimbiyot tabanlı farklı mücadele stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Zararlı böcek popülasyon kontrolünde *Wolbachia*'nın böcek üretmesi üzerine olumsuz etkilerinden, *Spiroplasma*'nın ise böcek sağlığı üzerine olumsuz etkilerinden faydalanılarak yeni mücadele yöntemleri geliştirilebilir.

Bunun dışında endosimbiyotların böcek sağlığına olumlu etkileri (patojen ve parazitlere karşı savunma, çevreye adaptasyon, insektisit detoksifikasyonu) düşünüldüğünde, faydalı böceklerin yaşamsal kondisyonlarını arttırabilmek için endosimbiyot tabanlı böcek sağlığını destekleyici stratejiler de geliştirilebilir.

Kaynaklar

- Ballinger MJ, Perlman SJ. 2018. The defensive *Spiroplasma*. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 32: 36-41. DOI: 10.1016/j.cois.2018.10.004.
- Carvalho GA, Correa AS, Oliveira LO, Guedes RNC. 2014. Evidence of horizontal transmission of primary and secondary endosymbionts between maize and rice weevils (*Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*) and the parasitoid *Theocolax elegans*. *Journal of Stored Products Research*, 59: 61-65. DOI: 10.1016/j.jspr.2014.05.004.
- Chen SJ, Lu F, Cheng JA, Jiang MX, Way MO. 2012. Identification and Biological Role of the Endosymbionts *Wolbachia* in Rice Water Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 41(3): 469-477. DOI: 10.1603/EN11195.
- Dunbar HE, Wilson ACC, Ferguson NR, Moran NA. 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol.*, 5: e96. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050096.
- Fein EZ, Perlman SJ. 2004. Distribution of the Bacterial Symbiont *Cardinium* in Arthropods. *Molecular Ecology*, 13: 2009-2016. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02203.x.
- Goodacre SL, Fricke C, Martin OY. 2015. A screen for bacterial endosymbionts in the model organisms *Tribolium castaneum*, *T. confusum*, *Callosobruchus maculatus*, and related species. *Insect science*, 22(2): 165-177. DOI: 10.1111/1744-7917.12096.
- Gündüz AE, Douglas E. 2009. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 987-991. DOI: 10.1098/rspb.2008.1476.

- Heddi A, Charles H, Khatchadourian C. 2001. Intracellular Bacterial Symbiosis in the Genus *Sitophilus*: The 'Biological Individual' Concept Revisited. *Research in Microbiology*, 152: 431–437. DOI: 10.1016/S0923-2508(01)01216-5.
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H, Nardon P. 1999. Four Intracellular Genomes Direct Weevil Biology: Nuclear, Mitochondrial, Principal Endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 6814–6819. DOI: 10.1073/pnas.96.12.6814.
- Henri H, Mouton L. 2011. High-Resolution Melting Technology: A New Tool For Studying the *Wolbachia* Endosymbiont Diversity in the Field. *Molecular Ecology Resources*, 12: 75–81. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03064.x.
- Houk EJ, Griffiths GW. 1980. Intracellular symbiotes of the Homoptera. *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 161-87. DOI: 10.1146/annurev.en.25.010180.001113.
- Kaltenpoth M, 2009. Actinobacteria as mutualists: General healthcare for insects?. *Trends Microbiol.*, 17: 529–535. DOI: 10.1016/j.tim.2009.09.006.
- Ratzka C, Gross R, Feldhaar H. 2012. Endosymbiont tolerance and control within insect hosts. *Insect*, 15; 3(2): 553-72. DOI: 10.3390/insects3020553.
- Shokal U, Yadav S, Atri J, Accetta J, Kenney E, Banks K, Kataham A, Jaenike J, Eleftherianos L. 2016. Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. *BMC Microbiology*, 16: 16. DOI: 10.1186/s12866-016-0634-6.
- Su Chow B, Boulianne GL, Wilde A. 2013. The BAR domain of amphiphysin is required for cleavage furrow tip-tubule formation during cellularization in *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell.*, 24(9): 1444--1453. DOI: 10.1091/mbc.E12-12-0878.
- Tunçbilek AS, Bakir S, Derin I, Bilbil H. 2015. Screening of reproductive symbionts of *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* and their parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Integrated Protection of Stored Products IOBC-WPRS Bulletin*, Vol. 111, 511-517.
- Türkmen K, Koçak E. 2017. Türkiye’de Pirinç Biti (*Sitophilus oryzae*, Coleoptera: Curculionidae) Popülasyonlarında Endosimbiont Bakteri *Wolbachia* Enfeksiyonunun Belirlenmesi. p. 19. 3rd ASM, International Congress of Agriculture and Environment, 16-18 November 2017, Antalya.
- Vigneron A, Charif D, Monégat VC, Vallier A, Gavory F, Wincker P, Heddi A. 2012. Host Gene Response to Endosymbiont and Pathogen in the Cereal Weevil *Sitophilus oryzae*. *BMC Microbiology*, 12: 14. DOI: 10.1186/1471-2180-12-S1-S14.
- Vignesh S, Balachandar D, Mohankumar S. 2018. Variation in endosymbionts of phosphine resistant and susceptible key stored grain insect pests. *Madras Agric. J.*, 105(4-6): 201-205. DOI: 10.29321/MAJ.2018.000130.
- Werren JH, Zhang W, Guo L. 1995. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.*, 261: 55-63. DOI: 10.1098/rspb.1995.0117.
- 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. DOI: 10.1016/j.jspr.2016.09.008.
- Zientz E, Dandekar T, Gross R. 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68: 745–770. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.745-770.2004.