دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد 13، شماره4، سال 1400، (269-257)

شناسایی باکتریهای همزیست غالب دستگاه گوارش بید غلات(*Sitotorga cerealella*)

مجید کزازی[1*]، راحله مرادی[2]، غلام خداکرمیان[3]، عزت اله صداقت فر[4]

1- عضو هیات علمی گروه حشره شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان
2- کارشناس ارشد رشته حشره شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان
3- عضو هیات علمی گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه بوعلی سینا همدان
4- عضو هیات علمی گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

چکیده

بید غلات یکی از آفات مهم انباری است خسارت این آفت هم از نظر کیفیت وهم از لحاظ کمی دارای اهمیت زیاد است. در این پژوهش، باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش بید غلات شناسایی شد.برای پرورش بید غلات از جو اصلاح شده رقم آبیدر با درصد پروتئین بالا استفاده شد. ظرف حاوی جو بعد از آلوده سازی در اطاقک رشد در شرایط دمایی 1±24 درجه سلسیوس ورطوبت نسبی 5 ± 65 درصد نگهداری شدند. جهت جدا نمودن باکتری‌های دستگاه گوارش بید غلات از بین جمعیت پرورش داده شده 10 لارو سالم انتخاب شد. دستگاه گوارش لاروها پس از ضد عفونی در اتانول 70 درصد، هیپوکلریت سدیم 5درصد و آب مقطر خارج شد سپس جهت همگن نمودن دستگاه گوارش از یک میلی‌لیتر بافر فسفات 0.1مولار با pH=7 استفاده شد.
محتویات همگن و رقیق شده در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد

برای انجام واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز از5 میکرو لیتر Master Mix ، 2 میکرولیتر DNA استخراج شده ، 1.5 میکرولیتر پرایمر RP2 و 1.5 میکرو لیتر پرایمر FD1 و 15 میکرولیتر Distilled Water که حجم کلی این مواد باید به 25 میکرو لیتر برسد. فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی FD1 وRP2 و توالی ژن 16srRNA در دستگاه ترموسایکلرانجام شد. توالی یابی محصول PCR تهیه شده با همکاری شرکت Bioneerکره جنوبی انجام شد و نتایج در سایت NCBIمورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های فنوتیپی باکتری های جدا شده با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی مشخص شد. بعد از بررسی تمام کلونی های تهیه شده و مقایسه نتایج بدست آمده بیشترین فراوانی از نظر تعداد کلنی مختص به باکتری *Enterococcus mundtii* بود و باکتری *Enterobacter hormaechei* از فراوانی کمتری در دستگاه گوارش بید برخوردار بود. همچنین با توجه به الکتروفورز انجام شده بالاترین باندهای مشاهده شده مربوط به باکتری *Enterobacter hormaechei* و کوتاهترین باند متعلق به *Enterococcus mundtii* میباشد.

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *mkazzazi@gmail.com*

تاریخ دریافت مقاله:1400/10/13 – تاریخ پذیرش مقاله:1400/12/2

مقدمه

خسارت به محصولات کشاورزی توسط آفات، از زمان برداشت در مزرعه شروع و تا مصرف و انبار داری ادامه پیدا می کند(پلی مر ، 1982) .

زیان هایی را که آفات در انبار ها در سطح جهانی تنها به غلات وارد می کنند طبق گزارش سازمان خوار بار و کشاورزی ملل متحد هر سال به حدود 10 درصد محصول برداشت شده میرسد در مناطق گرمسیری و نیمه گمسیری جهان ، حشرات انباری هر سال 12 میلیون تن غلات مختلف را نابود می کنند و هر سال حدود 100 میلیون تن غلات نیز در اثر عدم مراقبت های لازم در انبار ها از بین میروند (باقری زنوز،1365).

آفات انباری علاوه بر زیان های کمی باعث خسارت کیفی محصولات انبار شده نیز می شوند اگر شرایط اکولوژیک برای فعالیت آفات مختلف فراهم باشد محصول به مدفوع و پوسته های لاروی حشرات و کنه ها و یا به فضولات جوندگان آلوده شده و از مرغوبیت آن کاسته می شود.

تغذیه از چنین محصولاتی بهداشت مصرف کننده را نیز ممکن است به مخاطره بیندازد . بارها دیده شده است اشخاصی که از مواد آلوده به کنه ها تغذیه کرده اند دچار مسمومیت های حاد و اختلالات گوارشی شدید شده اند .

بید غلات یا بید گندم (Sitotorga cerealella) از آفات مهم انباری در سراسر دنیاست که جز راسته ی بالپولک داران می باشد. البته پراکنش و پراکندگی این حشره در مناطق معتدل گرمسیری بیشتر است . میزبان این حشره در درجه اول گندم و ذرت در درجه دوم جو و ارزن و چاودار و به ندرت برنج می باشد . حشره بالغ به خوشه های نارس گندم و جو و ... حمله و خسارت به بار می آورد ولی خسارت اصلی را لاروهای این حشره به دانه های غلات می زنند .لارو های این حشره درون دانه ها زندگی کرده و خسارت می زنند این خسارت بصورت کیفی و کمی است زیرا لارو فضولات خود را درون دانه انباشته می کند و محصول بوی نامتبوع و تهوع آور دارد علاوه بر آن با تنیدن تارهای نازک در سطح محصولات انباری میتواند از ارزش اقتصادی آن بکاهد(باقری زنوز،1363).

عامل اصلی که به موفقیت حشرات در اشغال زیستگاه های متفاوت کمک می کند، تطابق آن ها با تغذیه از رژیم های غذایی گوناگون است (داو، 1986) .این قدرت تطابق عادات غذایی، اغلب به کمک همزیست و برخی عوامل دیگر صورت می گیرد. برآوردها نشان داده است که همزیست ها بیشتر در نزدیکی دستگاه گوارش مشاهده می شوند(ایشیکاوا ،1989 و موران ،2006).

میکرو ارگانیسم های همزیست دستگاه گوارش حشرات نقش مهمی در رشد ، توسعه و سازگاری محیطی میزبان خود ایفا می کنند. میکروارگانیسم های داخل بدن شامل میکروب های دستگاه گوارش، پارازیت های داخلی و همزیست های خارج یا داخل سلولی هستند. همزیستی داخل سلولی، نزدیک‌ترین ارتباط بین دو موجود زنده ی مختلف است و معمولاً استدلال می شود که این ارتباط طی تکامل انتخاب شود. با توجه به اینکه حشرات بزرگترین گروه بی مهره گان هستند مطالعه ی همزیست در حشرات مختلف برای شناخت بهتر چگونگی تکامل و آشنایی با رویدادهای اکولوژیکی دارای اهمیت است.

مطالعه و شناسایی میکروارگانیسم های همزیست حشرات در فیزیولوژی حشره و مدیریت آفت دارای اهمیت بالایی می باشد در واقع شناسایی میکروارگانیسم های همزیست در دستگاه گوارش بید غلات می‌تواند گامی در جهت تشخیص راه های کنترل این آفت با استفاده از برخی باکتری‌ها باشد.

مواد و روش ها

حشره بالغ بید غلات از پرورش های موجود در انسکتاریوم شرکت بیولوژیک سبزآوران همدان تهیه گردید سپس بر روی جو ضدعفونی شده با رطوبت 15 درصد ریخته شد.

ظرف حاوی جو بعد از آلوده سازی در اطاقک رشد در شرایط دمایی 24 درجه سلسیوس ورطوبت نسبی 60 تا 70 درصد نگهداری شدند(دانیالی،1373).

شکل 2-1 لارو سن آخر بید غلات را نشان می دهد.

تصویر 0-1: بید غلات

جهت جدا نمودن باکتری‌های دستگاه گوارش از بین جمعیت پرورش داده شده 10 لارو (سن 4) انتخاب و به مدت 24 ساعت در شرایط گرسنگی نگهداری و سپس لاروها ضد عفونی شدند(فریرا و همکاران ، 1998).

بعد از خارج کردن دستگاه گوارش لاروها ، دستگاه گوارش همگن شد. محتویات همگن و رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر در محیط کشت نوترینت آگار کشت نموده وکلنی‌های تشکیل شده بر اساس شکل ، رنگ و مورفولوژی دسته‌بندی و از هر کلنی یک نمونه انتخاب و به محیط کشت حاوی نوترینت آگار منتقل و کشت داده شد. پس از 7 تکرار کشت‌های خالص از هر استرین تهیه شد. ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌ها بر پایه روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی شامل رنگ آمیزی گرم ، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز و آزمون تولید اسید از قند تعیین شد (شاد و همکاران 2003). برای پی بردن به تنوع استرین‌های همزیست حشرات از استخراج پروتئین و الکتروفورز آن روی ژل پلی‌آکریل آمید استفاده شد(نوروزی، 1389).

جهت استخراج DNA باکتریایی، نیاز به تهیه سوسپانسیون باکتری می باشد ، ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. بعد از 48 ساعت باکتری‌ها توسط یک لوب استریل از سطح محیط کشت جمع‌آوری و داخل ارلن حاوی آب مقطر دو بار تقطیر ریخته شد باکتری را به اندازه ای به ارلن حاوی آب مقطر اضافه میکنیم که محلول شیری رنگی به دست آید، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج 600 نانومتر غلظت این سوسپانسیون تعیین شد(جیانگ و همکاران ،2006).

برای انجام واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز از5 میکرو لیتر Master Mix (که شامل آنزیم Taq DNA Polymerase ، dNTPS، Mgcl2 و آنزیم های پلیمراز می باشد) ، 2 میکرولیتر DNA استخراج شده 1/5 میکرولیتر پرایمر RP2 و 1/5 میکرو لیتر پرایمر FD1 و 15 میکرولیتر Distilled Water که حجم کلی این مواد باید به 25 میکرو لیتر برسد.برای استفاده از پرایمرها ابتدا هر پرایمربوسیله 150 میکرولیتر Distilled Water رقیق شد سپس 1/5

میکرولیتر از هر کدام مورد استفاده قرار گرفت.فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی FD1 و RP2 در دستگاه ترموسایکلرانجام شد (هوسوکاوا و همکاران ،2007).

لازم به ذکر است که با توجه به نوع پرایمر انتخابی بازه های دمایی مورد استفاده در بازه دمایی 50 تا 42 درجه سانتی گراد تنظیم شد و بهترین باند در دمای 42 درجه سانتی گراد حاصل شد همچنین مدت زمان لازم برای انجام این مرحله 2 ساعت و 45 دقیقه می باشد. شکل 2-8 بازه دمایی مورد استفاده را در PCR را نشان میدهد.

تصویر 2-0 : بازه دمایی استفاده شده

آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه‌ی 16SrDNA برای شناسایی باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش بید غلات در جدول 2- 4 آمده است.

جدول 1-0: آغازگر های مورد استفاده جهت شناسایی باکتری

نام ژن	نام آغازگر	توالی
16 s rDNA	FD1	Forward: 5'- AGAGTTGATCTGGCTCAG3'
16 s rDNA	RP2	Reverse: 5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3'

برای تهیه ژل آگارز ابتدا 0/6 گرم آگارز 2 درصد را در 40 سی سی TBE اضافه نمودیم ،محلول فوق را در ارلن ریخته و ارلن را در آب جوش قرار می دهیم تا آگارز در بافر حل شود ژل تهیه شده در الکتروفورز ریخته شد سپس 5 میکرولیتر محصول PCR با 2 میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگیری شدند و دو عدد از چاهک ها توسط DNA Markers به عنوان نردبان بارگیری شدند که DNA Ladeer اول از طول موج 0 تا 1500bs و DNA Ladeer دوم از طول موج 1500 تا 3000 bsرا مشخص می کند . سپس 200 سی سی TBE با 800 سی سی آب مقطر ترکیب شد و در مخزن ریخته شد.

دستگاه الکتروفورز به منبع تأمین نیروی برق با ولتاژ ثابت 110 ولت متصل گردید. پس از گذشت حدود یک ساعت جریان برق قطع گردید و ژل، جهت رنگ‌آمیزی به مدت 20 دقیقه در داخل محلول اتیدیوم بروماید با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، در دستگاه ژل داکیومنتیشن قرار داده شد(مارچلو وهمکاران ،2008).

توالی یابی محصول PCR تهیه شده با همکاری شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد و نتایج توالی یابی ژن 16S rRNAپس از ویرایش با منابع اطلاعاتی سایت NCBIمقایسه شد اطلاعات به صورت بانک ژن قابل مشاهده بوده و به صورت FASTA اطلاعات باکتری قابل بررسی و مشاهده میباشد.

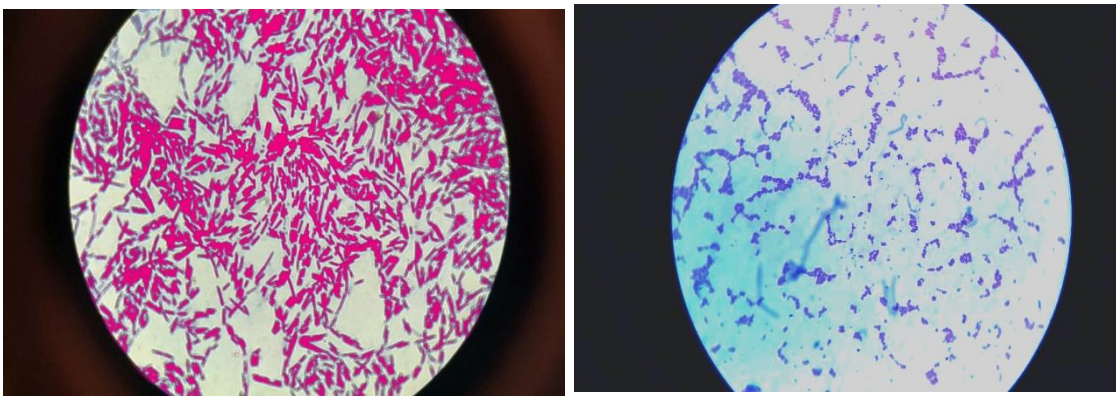
نتایج

با توجه به شکل ظاهری با کتری های استخراج شده از دستگاه گوارش بید غلات به 2 گروه تقسیم بندی شدند.عکس برداری از ژل انجام و باندهای پروتئینی که در طول ژل براساس اندازه‌شان از هم جدا شده بودند، با (DNA Ladder)مقایسه گردید.بالاترین باندهای مشاهده شده مربوط به باکتری *Enterobacter hormaechei* و کوتاهترین باند متعلق به باکتری *Enterococcus mundtii* میباشد. باندهای پروتئین الکتروفورز شده باکتری‌های همزیست در شکل3-2 نشان داده شده است.

جدول 3-1 نتیجه انجام آزمون های باکتری شناسی را نشان می دهد.

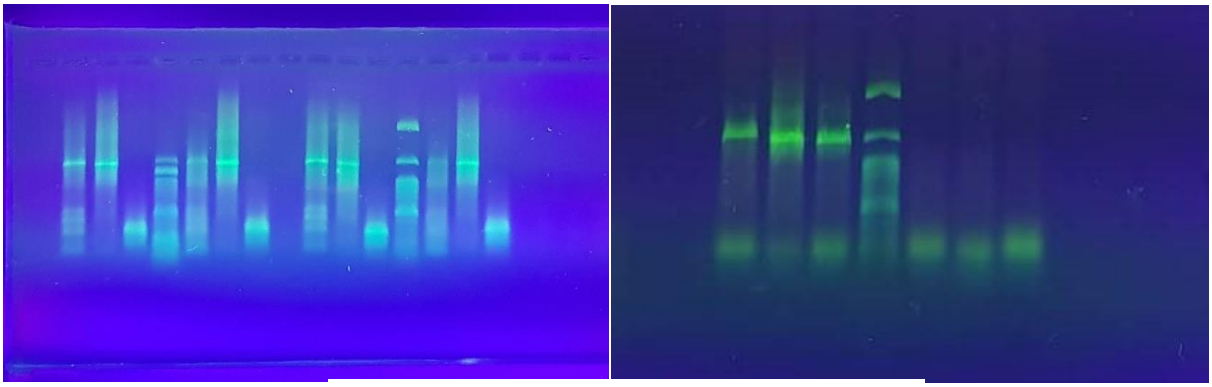
1-0:نتایج آزمون ها باکتری شناسی

نوع آزمون	باکتری Enterococcus mundtii	باکتری Enterobacter hormaechei
آزمون واکنش گرم	مثبت	منفی
آزمون کاتالاز	منفی	مثبت
آزمون اکسیداز	منفی	منفی
آزمون تولید اسید از قند	مثبت	مثبت



تصویر 1-0: آزمون گرم

باندهای پروتئینی مشخص شده توسط الکتروفورز با استفاده از پرایمر FD 1 و RP 2 ژل آگارز 2درصد در شکل 3-8 نشان داده شده است.



تصویر 0-2 : باندهای پروتئینی

نتایج محصولات PCR تکثیرشده در سایت NBCI توالی یابی شده و توالی های حاصل به فرمت FASTA به شرح زیر است.

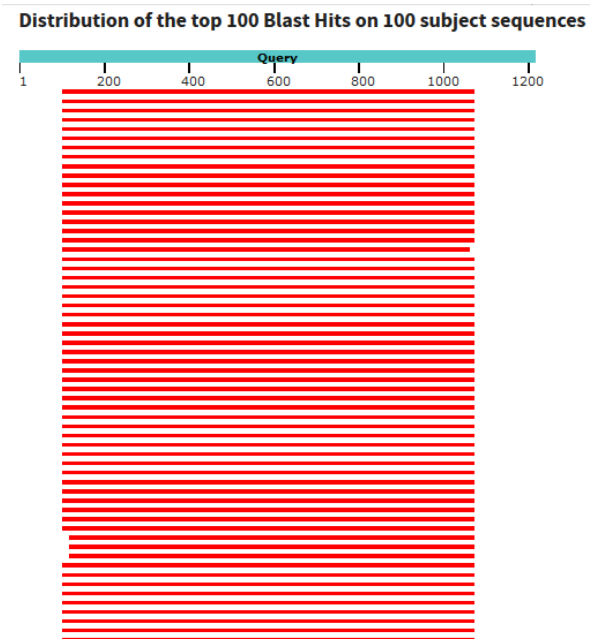
توالی باکتری **Enterococcus mundtii** *به فرمت FASTA*

NR_024906.1 Enterococcus mundtii strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence
ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTCCCACCGGAGCTTGCTCCACCG
GGAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGG
AAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTCGTTTTGAAAGGCGCTTTACGGTGCCG
CTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG
TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCC
ATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGTCGCGAG
GCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAG
ATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTC

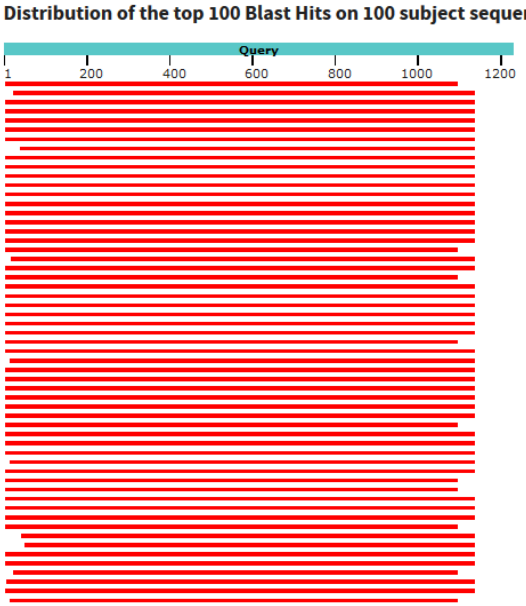
توالی باکتری Enterobacter hormaechei *به فرمت FASTA*

>NR_042154.1:231-1330 Enterobacter hormaechei strain 0992-77 16S ribosomal RNA, partial sequence
TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGYGTTGAGGTTAATAACCTCAGCA
ATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGAC
TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG
CAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTACCAGAGATGSTTTGGTGCCTTCGGGAA
CTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGATTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG

همچنین نتایج گرافیکی به دست آمده از BLAST نیز در شکل 3-9 و 3-10 نشان داده شده است.



تصویر 3-0: توالی باکتری Enterococcus mundtii در BLAST

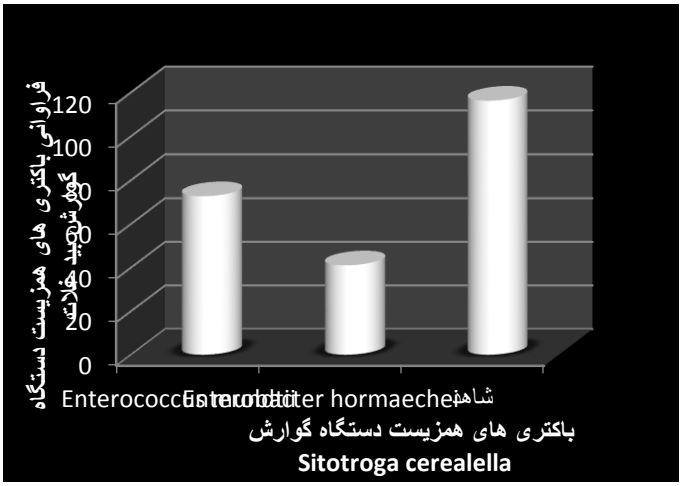


تصویر 4-0: توالی باکتری Enterobacter hormaechei به فرمت BLAST

برای تعیین فراوانی باکتری های استخراج شده بعد از بررسی تمام کلونی های تهیه شده و شمارش تعداد باکتری های موجود در هر محیط کشت با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 نتایج بدست آمده مشخص کرد که بیشترین فراوانی از نظر تعداد کلنی مختص به باکتری Enterococcus mundtii به مقدار 72/2 بود و باکتری hormaechei

Enterobacter به مقدار 37/6 از فراوانی کمتری در دستگاه گوارش بید برخوردار بود.میزان فراوانی شاهد هم با توجه به وجود هر دو باکتری به میزان 112/6 می باشد.

شکل 3-11 نمودار میانگین باکتری‌ها را در دستگاه گوارش بید غلات را نشان می‌دهد.



تصویر 0-5: نمودار میانگین باکتری های دستگاه گوارش بید غلات

بحث

با توجه به مصرف بی رویه آفت کش ها در کنترل آفات و عوارض ناشی از این مصرف، گرایش زیست شناسان به سمت روش های جایگزین از جمله شناسایی و تاثیر کنترل عوامل همزیست بر جمعیت آفات نوید مبارزه ای سالم را می دهد (کافیل و همکاران ، 2012).

مگس های خانواده *Tephritidae* نمونه ای از آفات پایدار و مخرب کشاورزی می باشد که تأثیر آن در انواع گیاهان زراعی در سراسر جهان مشاهده شده است وجود باکتری *Entobacter hormaechei* در دستگاه گوارش این حشره گزارش شده است.

طبق گزارش هاید و همکاران ، وجود باکتری *Entobacter hormaechei* بین گونه های مگس *Zeugodacus cucurbitae* به اثبات رسیده است(موریس،2014).

در چند سال اخیر تنوع میکروارگانیسم های حشرات مورد توجه قرار گرفته و با استفاده از تکنیک های زیست شناسی و مولکولی شناسایی و بررسی عملکرد آنها در بخشهای مختلف حشرات مورد ارزیابی قرار گرفته است (شانون و همکاران،2001).

در مگس *Glossina morsitans* وجود سه باکتری *Wolbachia* و *Serratia* و *Enterobacter hormaechei*به اثبات رسیده است که میزان باکتری *Wolbachia* از تراکم بالاتری برخوردار بوده است ، این باکتری در تغذیه آفت نقش دارد(شاو و همکاران، 2013).

در سال 2012 باکتری *Entobacter hormaechei* از دستگاه گوارش پشه های *Aedes* Aegypti و *Aedes albopictus* که از آفات مهم از نظر بهداشت عمومی محسوب می شوند توسط ولبورن و مادلین گزارش شد که در

مقاومت آفات نقش دارند ، همچنین وجود باکتری های *Actinobacteria* و *Firmicutes* و *Bacteroidetes* در دستگاه گوارش این دو آفت شناسایی شده است(یاداو و همکاران ،2015).

وجود باکتری Entobacter hormaechei کمک به متابولیسم نیتروژن در مگس می کند علاوه بر این باکتری Entobacter hormaechei در دستگاه گوارش مگس Ceratitis capitata به عنوان سدی در برابر باکتری های مضر، نقش مهمی در زندگی میزبان خود دارد (بهار و همکاران،2008).

وجود باکتری Enterococcus fecalis در دستگاه گوارش سوسک Harpalus pensylvanicus نشان داد که این باکتری در هضم رژیم غذایی دانه نقش دارد(کافمن وکلیگ ،1991).

مطالعات انجام شده بر روی پروانه diamondback moth نشان داد که باکتری غالب دستگاه گوارش این پروانه Enterococcus mundtii می باشد که احتمالا نقش مهمی در زنده مانی این پروانه دارد

همچنین این باکتری در دو گونه Bombyx mori و Trichoplusia ni نیز یافت شده است که نقش این باکتری در این دوگونه هنوز شناخته نشده است(ون هونگلی و همکاران ،2017).

باکتری Enterococcu mundtii عامل موفقیت حشره درسازگاری با منابع غذایی مختلف و باکتری Entobacter hormaechei در زنده مانی این آفت نقش دارند (اسپیتلر و همکاران،2000).

وجود باکتری Enterococcus mundtii در دستگاه گوارش پروانه Galleria mellonella گزارش شده است که این باکتری از طریق افراد ماده به فرزندان منتقل می شود(جوهستون و همکاران،2015).

باکتری Entobacter hormaechei در دستگاه گوارش لارو کرم ابریشم گزارش شده است که کمک به هضم پیله می کند(رانگان و همکاران ،2016).

باکتری Enterobacter hormaechei در سلولهای اپیتیال معده لارو chrysoperla carnea گزارش شده است که وظیفه هضم بقایای مانده در روده میانی را بر عهده دارد(بامان ،2005).

باکتری Enterococcus mundtii در سوسک Tribolium castaneum که از آفات مهم غلات در انبارها است گزارش شده وجود این باکتری در غذای دام هایی که از این غلات که آلوده به این باکتری هستند تغذیه می کنند سبب ایجاد بیماری می شود و این باکتری عامل بیماری زایی در دام ها محسوب می شود (کاریما و همکاران،2000).

باکتری Enterococcus mundtii در لارو Ephestia kuehniella گزارش شده است این باکتری به اکثر آنتی بیوتیک ها حساس است ، همچنین مقایسه بیان ژن در این باکتری نشان داد که برای زنده مانی از استراتژی های مختلفی استفاده می نماید و در متابولیسم نقش موثری دارد فعالیت ضد میکروبی در این باکتری به اثبات رسیده است (نت و همکاران2012).

باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش توانایی دخالت در رشد عصبی، تنظیم رفتار و مشارکت در اختلالات عصبی را داشته و قادرند با تاثیر برmicroRNA ، بیان ژن‌ها را در قسمتی از مغز حشره تنظیم کنند. دو مکانیسم، ترکیب میکروبی سیستم گوارشی را تعیین و تنظیم می‌کند :

1. رقابت بین باکتری‌های دستگاه گوارش
2. سیستم ایمنی میزبان

به نظر می‌رسد سیستم ایمنی میزبان نقش مهمی را در تنظیم باکتری‌های همزیست دارد(راسل و دان، 1996).

با توجه به مطالعات انجام گرفته وجود این دو باکتری در زنده مانی حشره و دخالت در هضم به صورت جزئی و متابولیسم می تواند موثر باشد.

باکتری Enterococcus mundtii و باکتری Entobacter hormaechei هر دو از آفات مهم بهداشتی هستند ، در صورت عدم استفاده از استراتژی های مناسب مدیریت آفت بر روی محصولات ذخیره شده ،حشرات می توانند به عنوان ناقل میکروارگانیسم های بیماری زا عمل کرده و خطرات سلامتی را برای مصرف کنندگان ایجاد کنند.

همزیست های دستگاه گوارش بالپولکداران محدود به تعداد انگشت شماری از گونه های باکتریایی است که دارای زیستگاه و رژیم غذایی متفاوت است اما غالب این باکتری های گوارشی انتروکوک هایی هستند که از طریق دگردیسی پایدار هستند(داگلاس،2015).

باکتری های همزیست دستگاه گوارش می توانند تحت تاثیر روابط مستقیم با میزبان بر روند رشد وگسترش میزبان تاثیرگذار باشند. دریافت سیگنال های باکتری های همزیست توسط سلول های اپیتلیومی دستگاه گوارش موجب ایجاد ایمنی و پایداری سلولی شده و برای سازگاری میزبان با تغییر محیط شرایط دستگاه گوارش ضروری است(بالسینگ و همکاران ،2016).

نقش همزیست های دستگاه گوارش لاروهای بالپولکدارن بسیار بحث برانگیز است. این حشرات فاقد ساختارهای تخصص یافته دستگاه گوارش هستند و انتقال در دستگاه گوارش می تواند به سرعت انجام پذیرد، بنابراین می توان گفت که احتمالا همزیست های دستگاه گوارش تنها نقش جزئی در هضم لاروهای بالپولکدارن می توانند داشته باشند(بینگل و اگتون، 1995).

باکتری‌های همزیست در دستگاه گوارش حشرات، نقش مهمی در تنظیم متابولیسم میزبان دارد. همچنین علاوه بر هضم غذا، با استخراج حداکثر انرژی از مواد غذایی مصرف شده توسط حشره، به میزبان خود کمک می‌کند و میزبان خود را از میکروب‌های بالقوه خطرناک محافظت می‌کند. علاوه بر عملکردهای مطلوب در داخل بدن میزبان خود، ممکن است بتواند در تعاملاتی که برای میزبان خود مضر است دخالت کنند به‌طور کلی نقش همزیست‌ها در سلامت میزبان خود شناخته شده است بنابراین درک نقش باکتری‌های همزیست در دستگاه گوارش حشرات، یک گام مهم به سوی فرآیند استفاده از باکتری‌ها در کنترل میکروبی گونه‌های آفات است.

مطالعه و شناسایی میکروارگانیسم های همزیست حشرات در فیزیولوژی حشره و مدیریت آفت دارای اهمیت بالایی می باشد.

Referance

Alzowahi, F. A., Abu-Taleb, A., As-Suhbani, A. and Kadam, T.A. (2013). "The inhibitory effects of garlic extract and its fractions against some Enterobacteriaceae sp isolated from sprouted Mung bean". International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2(7), pp.104-115.

Andersson, S. G., Westberg, J., Fuxelius, H.-H., Darby, A. and Cho, N.-H. 2007. Insect symbionts: From basic research to applications. Entomological Research, 37: A11-A73.

Adams,D.,Wilkinson, T.L. and Douglas,A.E., (1996), " The aphidbacterial symbiosis: a comparison between pea aphids and black bean aphids", Journal of Entomologia Experimentalis et Applicata, Vol. 80, pp275-278.

Adams, D. and Douglas, A.E., (1997), "How symbiotic bacteria influence plant utilisation by the polyphagous aphid, Aphis fabae", Journal of Oecologia, Vol. 110, pp 528-532.

Ankola, K., Brueckner, D. and Puttaraju, H.P., (2011), "Wolbachia endosymbiont infection in two Indian butterflies and female-biased sex ratio in the Red Pierrot, Talicada nyseus", Journal of biosciences, Vol.36, pp 845-850.

Ayvaz, A., Karaborklu, S., (2008), "Effect of cold storage and different diets on Ephestia kuehniella Zeller(Lep: Pyralidae)", Journal of pest science, Vol. 81, pp 57-62

Bacchetti De Gregoris, T., Aldred, N., Clare, A. S. & Burgess, J. G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa.Journal of Microbiological Methods 86, 351–356.

Baumann, P., L. Baumann, C.-Y. Lai, D. Rouhbakhsh, N. A. Moran, and M. A. Clark. 1995.Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus Buchnera: intracellularsymbionts of aphids Annual Review of Microbiology. 49: 55–94

Baumann, P., and N. A. Moran. 1997. Non-cultivable microorganisms from symbiotic association insect and other hosts. Antonie Leeuwenhoek 72: 38–48

Baumann, P., 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sapsucking insects, Annual Review of Microbiology. pp. 155-189.

Bhat, T.K., Singh, B. and Sharma, O.P.,)1998("Microbial degradation of tannins–a current perspective",Biodegradation, Vol. 9, pp 343-357.

Brownlie, J.C. and Johnson, K.N., 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. Trends in Microbiology. 17, 348-354.

Chen, X., S. Li, and S. Aksoy. 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus Glossina and its bacteriome-associated endosymbiont, Wigglesworthia glossinidia. Journal of Molecular Evolution 49–58.

Chu, C.-C., Gill, T. A., Hoffmann, M., & Pelz-Stelinski, K. S. 2016. Inter-Population Variability of Endosymbiont Densities in the Asian Citrus . Microbial Ecology, 71, 999–1007.

Chapman, R.F., (2013), "The Insects Structure and Function", 5th edition. Cambridge Uni. Press,Cambridge, pp 901.

Chih,W.W., Li, L., Jen-Wei, L., and Shaw-Yhi, H., (2003), "Host-plant utilization of two Luna moth (Actiasspp.) On Liquidambar formosana and Cinnamomum camphora", Vol, 23, pp49-57.

Chun, Y. and Yin, Z.D., (1998), "Glycogen assay for diagnosis of female genital Chlamydia trachomatis infection", Journal of clinical microbiology, Vol. 36, pp 1081-1082.

Cohen, R.W., (2001), "Diet balancing in the cockroach Rhyparobia madera: Does serotonin regulate this behavior?", Journal of Insect Behavior, Vol.14, pp 99-111.

Collins, P.J., Daglish, G.J., Pavic, H., Lambkin, T.M., Kopittke, R., and Bridgeman, B.W.,(2002),"Combating strong resistance to phosphine in stored grain pests in Australia", pp. 109─112.

Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., Bourtzis, K., Mandrioli,M.,Cherif, A. and Bandi, C., (2010), "Acetic acid bacteria, newly emerging

athol. 67, 11–14.

Dillon, R.J., Dillon, V.M., (2004), "The gut bacteria of insects, nonpathogenic nteractions". Annual Reviews in Entomology, Vol. 49, pp 71-92.

Dillon, R.J., Vennard, C.T., Charnley, A.K., (2002), "A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone", Journal of Applied Microbiology, Vol. 92, pp 759-763.

Domingo, S.J.W., Kaufman, M.G., Klug, M.J., Holben, W.E., Harris, D., and Tiedje, J.M., (1998), "Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets", Journal of olecular Ecology, Vol. 7, pp 761–767.

Douglas, A.E., (1992), "Microbial brokers of insect-plant interactions", In Proceedings of the 8th international symposium on insect-plant relationships series entomologica, Vol. 49, pp 329-336.

Douglas, A.E., (1998), "Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera", Annual review of entomology, Vol. 43, pp 17-37.

Erturk, O., Demirbag, Z., (2006), "Studies on bacterial flora and biological control agent of Cydia pomonellaL.(Lepidoptera: Tortricidae)", African journal of biotechnology, Vol. 5, pp 2081–2085.

Zibaee, A., Zibaee, I. and Sendi, J.J., (2011), "A juvenile hormone analog, pyriproxifen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of Eurygaster integriceps Puton (Hemiptera:Scutelleridae)", Pesticide biochemistry and physiology, Vol. 100, pp 289-.892

Zurek, L. and Keddie, B.A., (1996), "Contribution of the colon and colonie bacterial flora to metabolism and development of the american cockroach Periplaneta americana L", Journal of insect physiology, Vol. 42, pp 743-.847.

Journal of Entomological Research

Volume 13, Issue 4, pages: 257-269

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Identification of *Sitotorga cerealella* digestive system predominant symbiotic bacteria

M. Kezazi[1*], R. Moradi[2], Gh. Khodakarmian[3], E. Sadaqat Far[4]

1- member of the scientific faculty of the Department of Entomology, Bu- Ali Sina University, Hamedan
2- MSc. of Plant Protection, Entomology, Bu- Ali Sina University, Hamedan
3-member of the scientific faculty of the Department of Plant Pathology, Bu- Ali Sina University, Hamedan
4- member of the scientific faculty of the Department of Plant Pathology, Islamic Azad University, Arak branch

Abstract

Sitotorga cerealella is one of the important storage pests .The damage of this pest is very important both in terms of quality and quantity .In this study,symbiotic bacteria of Sitotorga cerealella were identified.Modified barley of Abidar cultivar with high protein content was used to grow grain moth. Containers containing barley were stored in a growth chamber at a temperature of 24 ° C and a relative humidity of 65% after contamination. To separate the bacteria of Sitotorga cerealella gastrointestinal tract,10 healthy larvae were selected from the reared population. After disinfection, the larvae gastrointestinal tract was removed with ethanol 70%, sodium hypochlorite and distilled water5%. Then, one milliliter of 0.1 M phosphate buffer with pH 7 was used to homogenize the gastrointestinal tract. The homogeneous and diluted contents were cultured in nutrient agar medium .To perform polymerase chain reactions from 5 µl of Master Mix ,2 µl of extracted DNA, 1.5 µl of RP2 primer and 1.5 µl of FD1 primer and 15 µl Distilled Water that the total volume of these materials should reach 25 microliters. The PCR process was performed using general primers FD1 and RP2 and 16srRNA gene sequence in a thermocycle.The PCR product sequencing was performed in collaboration with South Korea&amps Bioneer and the results were reviewed at the NCBI site. The phenotypic characteristics of the isolated bacteria were determined by standard bacteriological methods. After reviewing all the prepared colonies and comparing the obtained results, the highest frequency in terms of number of colonies was specific to Enterococcus mundtii and Enterobacter hormaechei was less abundant in the gastrointestinal tract of Sitotorga cerealella. Also, according to electrophoresis, the highest bands observed belong to Enterobacter hormaechei and the shortest band belongs to Enterococcus mundtii.

Keywords: Enterococcus mundtii Enterobacter hormaechei، Sitotorga cerealella

* Corresponding Author, *mkazzazi@gmail.com*
Received: 3 Jan. 2022 – Accepted: 21 Feb. 2022