

Bazı Sinek (Dizi: *Diptera*) Türlerinde *Wolbachia* spp'nin PZR ile Araştırılması

Cem Ecmel ŞAKİ¹ Sami ŞİMŞEK¹

¹ Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-23119 Elazığ - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-10306

Özet

Wolbachia spp., *Rickettsia* soyundan gram negatif hücre içi bir bakteri olup, arthropodlarda yatay ve dikey olarak taşınmakta, üreme ile ilgili dokularında da bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı farklı tür erkek ve dişi sineklerde *Wolbachia* spp'nin PZR ile aranmasıdır. Bu amaçla 33 dişi ve 15 erkek *Musca* spp., 30 dişi ve 7 erkek *Lucilia sericata*, 16 dişi ve 4 erkek *Calliphora vicina*, 1 dişi ve 4 erkek *Sarcophaga haemorrhoidalis* ile 27 dişi ve 10 erkek *Chrysomia albiceps* kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonundan sonra *Wolbachia* wsp (*Wolbachia* surface protein) genini çoğaltan spesifik primerler ile PZR yapılmıştır. Çalışma neticesinde pozitif kontrol örneğinde 630 bp'lik band gözlenirken, negatif kontrol ve test edilen hiçbir örnekte pozitiflik belirlenmemiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez bazı *Diptera* populasyonlarında *Wolbachia* spp. moleküler olarak araştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Musca*, *Lucilia*, *Chrysomia*, *Calliphora*, *Sarcophaga*, *Wolbachia*, PZR

Investigation of *Wolbachia* spp in Some Flies Species (Order: *Diptera*) by PCR

Summary

Wolbachia is a gram negative intracellular parasite from *Rickettsia* family which is located into reproductive organs of arthropods and transmitted by horizontally and vertically. The aim of this study was to investigate of *Wolbachia* spp. in different species of flies by PCR. For this aim, 33 females and 15 males of *Musca* spp., 30 females and 7 males of *Lucilia sericata*, 16 females and 4 males of *Calliphora vicina*, 1 female and 4 males of *Sarcophaga haemorrhoidalis* and 27 females and 10 males of *Chrysomia albiceps* adult flies were used. After the isolation of genomic DNA, the specific primers were used and PCR was performed for the amplification of *Wolbachia* wsp (*Wolbachia* surface protein) gene. As a result, the positive control sample yielded 630 bp band while negative control and none of the tested samples yielded band. In conclusion, *Wolbachia* spp has been molecularly investigated in some *Diptera* populations for the first time in Turkey.

Keywords: *Musca*, *Lucilia*, *Chrysomia*, *Calliphora*, *Sarcophaga*, *Wolbachia*, PCR

GİRİŞ

Diptera dizisinde myiasise sebep olan sineklerin oluşturdukları hastalıkların yanı sıra bazı patojenleri de taşıdıkları bilinmektedir^[1-4].

Wolbachia, *rickettsia* soyundan hücre içi bir bakteri olup, omurgasızların üreme ve diğer dokularında bulunmaktadır. *Wolbachia*, insektlerde en yaygın olarak gözlenen endosimbiyotik bakterilerden biri olup maternal olarak nakledilen bir alfaproteobakteridir. Bu bakteri çok farklı insekt türleri ve filarial nematodlardan bildirilmiş olup, insekt türlerinin %15-20'sinde bulunduğu saptanmıştır. Bu bakteri hücre

içi bir döngüye sahip olup, enfeksiyon insekt türlerinin somatik ve üreme dokularında geçmektedir. *Wolbachia*'nın konağında birtakım reproduktif değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında, geniş bir insekt grubunda sitoplasmik uyumsuzluk, *Hymenoptera*'larda partenogenezis, *Isopod*'ların erkeklerinde genetik feminizasyon ve erkeklerde ölüm bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı *Wolbachia*'nın medikal, veteriner ve tarımsal önemi olan arthropodların biyolojik kontrolünde kullanılabileceği düşünülmektedir^[5].



İletişim (Correspondence)



+90 532 5431309



cesaki@yahoo.com

Mekanizması henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, *Wolbachia*'nın insekt soyları arasında horizontal naklinin şekillendiği bilinmektedir. Bu nedenlerle adı geçen bakteriyi insekt türleri arasında oldukça yaygındır. West ve ark.^[6], İngiltere'deki insektlerin %22'sinin *Wolbachia* ile enfekte olduğunu bildirmişlerdir. *Wolbachia*'nın gerçek prevalansının halen tam olarak tahmin edilemediği ve bütün insekt türlerindeki yaygınlığının %76'lara kadar çıkabileceği bildirilmektedir^[7].

Bu çalışmanın amacı, Elazığ ilinden elde edilen farklı Diptera türlerinde *Wolbachia*'nın yaygınlığını PZR ile belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılmak üzere toplanması planlanan sinekler için Elazığ ili merkez kesimhaneleri civarında sinek popülasyonunun yoğun olduğu günün sıcak saatlerinde kokuşmuş materyal ve insektisitten oluşmuş tuzaklar kullanılmıştır. Tuzaklardan toplanan sinekler laboratuvara getirilerek temizlenmiş ve %70'lik alkol bulunan şişelerde muhafaza edilmiştir. Daha sonra ilgili literatürler^[8,9] ışığında tür ve cinsiyetleri belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan sinek türleri, sayısı ve cinsiyetleri *Tablo 1*'de verilmiştir.

Genomik DNA izolasyonundan önce, her türün erkek ve dişilerinden ayrı ayrı sinek havuzları oluşturulmuş, %70'lik etanolden çıkarılan sinekler 1X PBS ile en az 5 kez yıkandıktan sonra steril tüplerde parçalanıp eppendorf tüplere alınmış ve üzerlerine Fermentas genomik DNA izolasyon kit içeriğinde bulunan digestion solüsyonundan 180 µl ve 25 µl proteinaz-K eklenerek 56°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kit protokolü takip edilerek gDNA izolasyonu tamamlanmış ve PZR kuruluncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

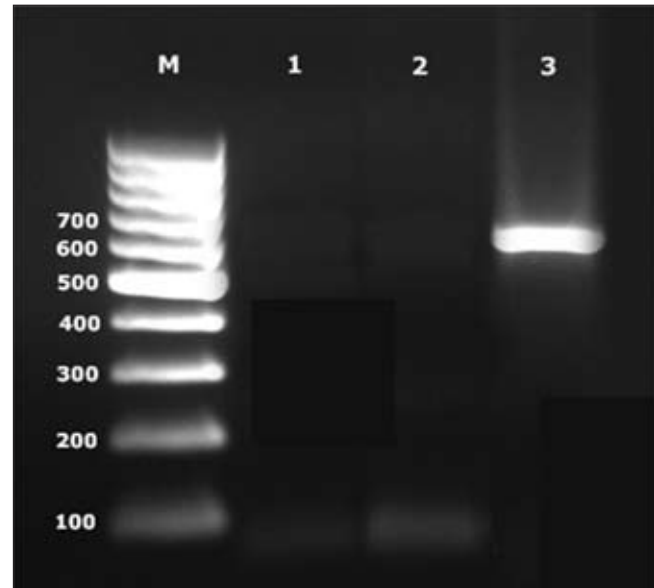
Tablo 1. Çalışmada kullanılan sinek türlerinin sayısı ve cinsiyetleri
Table 1. Number and genders of fly species used in the study

Tür	Cinsiyet	Adet (n)
<i>Musca</i> spp.	Dişi	33
<i>Musca</i> spp.	Erkek	15
<i>Lucilia sericata</i>	Dişi	30
<i>L. sericata</i>	Erkek	7
<i>Chrysomya albiceps</i>	Dişi	27
<i>Ch. albiceps</i>	Erkek	10
<i>Calliphora vicina</i>	Dişi	16
<i>C. vicina</i>	Erkek	4
<i>Sarcophaga haemorrhoidalis</i>	Dişi	1
<i>S. haemorrhoidalis</i>	Erkek	4
Toplam		147

Eldeki genomik DNA örneklerinde *Wolbachia* spp. DNA'sının aranması amacıyla *Wolbachia* wsp (*Wolbachia* surface protein) genini çoğaltan spesifik primerler ile (Forward 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3', reverse 5'-AAAATTAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3') PZR yapılmıştır. Bu amaçla; 5 µl 10X PZR buffer, 5 µl MgCl₂, 125 µM dNTP, her primer çiftinden 20 pmol, 0.2 µl Taq DNA Polymerase (5 IU) ve 5 µl genomik DNA içeren PZR karışımı hazırlanmış ve 94°C'de 3 dak.; 94°C'de 1 dak., 52°C'de 1 dak. ve 72°C'de 1 dak. (40 siklus) ve 72°C'de 5 dak. son uzama aşamalarından oluşan PZR şartlarına tabi tutulmuştur. Takiben PZR ürünleri %1.4'lük agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV transilluminatörde görüntülenmiştir. Bu işlem Zhou ve ark.'nın^[10] bildirdiği şekilde uygulanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak, Lethbridge Research Center'da (Alberta, Kanada) Prof. Dr. Kevin Floate'dan temin edilen enfekte bir *Haematobia* spp sineğinden gDNA izolasyonu ile elde edilen *Wolbachia* DNA'sı kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışma neticesinde pozitif kontrol örneğinde 630 bp'lik band gözlenirken, negatif kontrol ve test edilen hiçbir örnekte pozitiflik belirlenememiştir (*Şekil 1*).



Şekil 1. *Wolbachia* wsp primerleriyle çoğaltılmış PZR ürünlerinin görünümü. M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp); 1: Negatif Kontrol; 2: Örnek; 3: Pozitif Kontrol (630 bp)

Fig 1. PCR products of amplified with *Wolbachia* wsp primers. M: Molecular weight marker (100 bp); 1: Negative control; 2: Sample; 3: Positive control (630 bp)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Wolbachia, konaklarıyla mutual bir ilişkiye sahip olduğu için bu bakterinin konaktan ayrılması ile parazit tedavisi daha etkili sonuç verebilmektedir. Çünkü *Wolbachia* dişi

eklem bacaklılarda partenogenezisi uyarmakta, dolayısıyla *Wolbachia* tedavisiyle insekt popülasyonu azaltılabilmektedir [3]. Nitekim *Wolbachia* enfeksiyonunun bazı *Crustacea*'larda ve *Lepidoptera* türlerinde genotipik erkekleri, fenotipik fonksiyonel dişilere çevirdiği belirlenmiştir [11,12].

İran'da yapılan bir çalışmada [3], 770 arthropod (22 soya ait) ve 41 nematod (6 soya ait) *Wolbachia* yönünden araştırılmış ve %14.08'lik bir pozitiflik bulunmuş ve bu oranın daha yüksek olabileceği belirtilmiştir. Bahsi geçen çalışmada incelenen 7 cinse ait arthropodların 167'si pozitif bulunmuştur. İncelenen örnekler içerisinde pozitif olarak tespit edilen *Diptera* takımıyla yer alan sineklerden en fazla *Drosophila melanogaster* en az olarak da *Musca domestica* tespit edilmiştir. *Sarcophaga haemorrhoidalis* örnekleri ise negatif bulunmuş ve sineklerde tespit edilen *Wolbachia*'nın A tipi *Wolbachia* olduğu belirlenmiştir.

Werren ve Windsor [13], aynı PZR metodunu kullanarak, Kuzey Amerika'daki insektlerin %19.3'ünün *Wolbachia* ile enfekte olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, insekt takımları arasında B tipi *Wolbachia* yerine A tipi ile enfeksiyon oluşması ile ilgili kesin bir farklılığın olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle, *Hymenoptera*'lar A tipi *Wolbachia* ile daha yüksek enfeksiyon oranı gösterirken, *Lepidoptera*'larda B tipi daha yüksek gözlenmiştir. Bu sonuçlar, A ve B tipi *Wolbachia*'ların farklı takım insektleri enfekte edebilme yeteneklerinin olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Bizim çalışmamızda hiçbir örnekte *Wolbachia* pozitifliği elde edilemediği için tiplendirme de yapılamamıştır. Çalışmada incelenen sineklerin hiçbirinde *Wolbachia* spp. tespit edilememesinin nedeni, bu sineklerin *Filaria* grubundaki nematodlara arakonakçılık yapmaması olabilir. Çünkü *Wolbachia* spp. *Filarial* nematodlar tarafından taşınmakta ve arthropodları da bu yolla enfekte etmektedir. Türkiye'de

ilk kez yapılan bu araştırma ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalara kaynak teşkil edebilecektir.

KAYNAKLAR

- Baumgartner DL:** Review of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 30 (2): 338-352, 1993.
- Fischer O, Matlova L, Dvorska L, Sivastova P, Bartl J, Melicharek I, Weston RT, Pavliák I:** *Diptera* as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med Vet Entomol*, 15, 208-211, 2001.
- Pourali P, Roayaei Ardakani M, Jolodar A, Razi Jalali MH:** PCR screening of the *Wolbachia* in some arthropods and nematodes in Khuzestan province. *Iranian J Vet Res*, 10 (3): 216-222, 2009.
- Tachibana SI, Numata H:** Seasonal prevalence of blowflies and flesh flies in Osaka City. *Entomol Sci*, 9, 341-345, 2006.
- Dobson S, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL:** *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol*, 29, 153-160, 1999.
- West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HCJ:** *Wolbachia* in two insect host parasitoid communities. *Mol Ecol*, 7, 1457-1465, 1998.
- Jeyaprakash A, Hoy MA:** Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: Wsp sequences found in 76% of sixty three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 9, 393-405, 2000
- Bei-Bienko GY:** Keys to the Insects European Part of the USSR. Part 2. Smithsonian Institution Libraries and the National Science Foundation. Washington, D.C. 1988
- Zumt F:** Myiasis in Man and Animals in the Old World, Butterwoths & Co. Ltd. London, 1965.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S:** Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using Wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B*, 265, 509-515, 1998.
- Juchault P, Frelon M, Bouchon D, Rigaud T:** New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods. *C R Acad Sci Paris*, 317, 225-230, 1994.
- Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S, Ishikawa Y:** Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity*, 88, 444-449, 2002.
- Werren JH, Windsor DM:** *Wolbachia* infection frequency in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc London, B Biol Sci*, 267, 1277-1285, 2000.