

Xiphydria prolongata odun yaban arısında bağırsak bakteri florasının karakterizasyonu

Mahir Budak^{1*} ve Ertan Mahir Korkmaz¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü / Fen Fakültesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Türkiye

*(budakmah@gmail.com) Başlıca yazarın mail adresi

Özet – Xiphidriidlerin larvaları ağaç kurdudur ve bilindiği yerlerde ağaçların ve çalılıkların zayıflamış veya ölmekte olan küçük dallarını tercih ederler. Bazı Nearktik ve Palearktik türlerin konakçıları arasında *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Salix*, *Populus*, *Tilia*, *Ulmus*, *Carpinus* ve *Fagus* gibi bitkiler bulunur. *Xiphydria prolongata* (Geoffroy, 1758) ağırlıklı olarak *Salix*, *Populus* ve *Ulmus* gibi geniş yapraklı ağaçlarda kolonize olur. Larvaları söğüt ağaçlarının yeşil kabuklu gövdeleri ile beslenir ve ağacın gelişimine zarar verir. Bitkilerin selüloz gibi dokularını sindirebilmek için bu böcekler mantarlar ve bakteriler ile simbiyoz bir ilişki içerisindeyler. *Xiphydria* cinsine ait diğer bazı türlerin mantar simbiyontları hakkında literatür bilgisi olmasına rağmen bakteri simbiyontları hakkında çalışma yoktur. Yapılan çalışma ile *X. prolongata* türünün bağırsak bakteri florası 16S metabarkotlama tekniği ile karakterize edilmiştir. Yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak 16S rRNA genlerinin V3-V4 hiper-değişken bölgesinin amplikonları ileri ve geri yönlü dizilenmiştir. Elde edilen kısa okumaların karakterizasyonu Qiime2 yazılımı kullanılarak linux ortamında gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan MOTU'lerin taksonomik statüleri Silva v138 veritabanı referans alınarak %97 benzerlik oranına göre oluşturulmuştur. Takson atama analizleri sonucunda tanımlanan bakterilerin çoğunluğunun Proteobacteria şubesine ait oldukları anlaşılmıştır. Bağırsak florasının büyük kısmını (%91,52) *Sodalis* cinsine ait bakteriler oluşturmaktadır. *Sodalis* bakteri türlerinin böcek bağırsağında biyofilmler oluşturması ve bazı vitaminleri üretmesi dikkat çekmektedir. Çalışma kapsamında bağırsak florasında bulunan yaygın bakteri cinsleri *Sphingomonas* ve *Pseudomonas* olarak belirlenmiştir. Bu bakterilerin insektisit dirençliliğinde rolü olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler – *Xiphydria Prolongata*, 16S Metabarkotlama, Bağırsak Mikroflorası, Yeni Nesil Dizileme, Odun Yaban Arısı.

I. GİRİŞ

Xiphydria prolongata (Geoffroy, 1758) (Hymenoptera: Xiphidriidae) türü *Xiphydria* cinsine ait tanımlanmış 36 türden biri olup, konak bitki olarak özellikle fizyolojik açıdan zayıflamış söğüt ağaçlarını tercih ettikleri için söğüt odun arısı olarak da bilinirler [1]. Aynı zamanda kavak, karaağaç, kızılbaş ve gürgen gibi geniş yapraklı ağaçların da konak bitkileri arasında yer aldığı rapor edilmiştir [2]. Holoarktik yayılış sergileyen bu tür Türkiye'de *Salix alba*, *S. fragilis*, *Populus nigra*, *Ulmus carpinifolia* türlerinde tespit edilmiştir [3]. Mayıs-Haziran ayları arasında gerçekleşen ergin çıkışları sonrasında, döllenmiş ergin dişi bireyler

yumurtalarını 2 ila 3 mm kalınlıktaki kabuk kısımlarının çatlamış bölgelerine bırakırlar. Larvaları konak bitkilerinin yeşil kabuklu gövde kısmında delik açarak beslenmelerinden ötürü konağa zarar verirler. Tek bir gövdeden çıkan yüzden fazla ergin birey aracılığıyla yüksek bulaşık oranlarına ulaşabilirler [4].

X. prolongata larvaları, diğer odun arılarına benzer bir şekilde konak bitkilerinin selüloz gibi kompleks dokularını sindirebilmek için mantarlar ve bakteriler ile simbiyotik bir ilişki içerisindeyler. Bu odun arılarının obligat simbiyotik ilişkileri hakkında çok az bilgi mevcut olup, özellikle ekonomik açıdan öneme sahip mantarların geleneksel yaklaşımlarla tanımlanmasına yöneliktir

[5]. Konak bitki polimerlerinin monomerlerine ayrıştırılarak sindirilebilir düzeye getirilmelerinde bu mantarların ve bakterilerin rollerinin anlaşılabilmesi için böcek ergin ve larval evre bağırsak florasına odaklanmak ve ilkin aşamada buradaki mikrobiyotayı tanımlamak gerekmektedir. Bu kapsamda son yıllarda böcek bağırsak mikrobiyotası ve konak bitki arasındaki etkileşime ve bakterilerin bu etkileşimdeki rollerinin anlaşılmasına yönelik artan bir ilgi vardır. Örneğin, balsam göknarı testereli arısı *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Symphyta: Diprionidae) bağırsak florasının karakterizasyonuna ve Formicidae (Hymenoptera: Apocrita) familyasını temsilen dört cinse ait bağırsak mikrobiyotasının belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda bu simbiyotik mikrobiyota üyelerinin çoğunlukla Pseudomonadota ve Bacteroidota filumlarından oldukları rapor edilmiştir [6], [7]. Ayrıca, bu çalışmalar sonucunda mikrobiyota bileşenlerinin böcek konak bitki etkileşimlerindeki potansiyel işlevlerde çok büyük farklılıklar sergiledikleri ortaya konmuştur [8].

Günümüzde, böcek bağırsak mikrobiyotası hem kültür bağımlı hem de kültür bağımsız yaklaşımlar kullanılarak tanımlanmaya çalışılmaktadır [8]. Ancak, 16S rRNA gen bölgesinin ampikon inşasına ve yeni nesil dizileme (NGS) ile dizilenmesine dayalı kültür bağımsız moleküler ekolojik yaklaşımlar, böcek bağırsak mikrobiyotasının daha kapsamlı bir karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu kapsamda, bu çalışmada ilk kez bir "xiphydrid" üyesi olan söğüt odun arısı *X. prolongata* türünün bağırsak mikrobiyotasının ilkin (öncül) karakterizasyonu kültür bağımsız bir yaklaşım olan ampikon dizileme ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonuçlarına güncel metabarkodlama analizleri uygulanmış ve mikrobiyota içeriğinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında *X. prolongata* türüne ait Sivas Cumhuriyet Üniversitesi kampüsünden toplanan 5 dişi birey kullanılmıştır. Arazi çalışmalarında toplanan örnekler zaman kaybetmeksizin içerisinde %99'luk etanol (EtOH) bulunduran böcek toplama tüpleri içerisine konulmuştur. Laboratuvar ortamına getirilen örneklerin alkoller periyodik olarak değiştirilerek çalışma zamanına kadar -20 °C' de saklanmıştır.

Sterio mikroskop altında böceklerin bağırsakları DNA izolasyonu için ayrılmıştır. Total genomik DNA QIAGEN marka (DNeasy Blood & Tissue Kit) hazır kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon basamakları ilgili firmanın temin etmiş olduğu kitapçıktaki yönergeler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

A. Kütüphane Hazırlama ve Dizileme

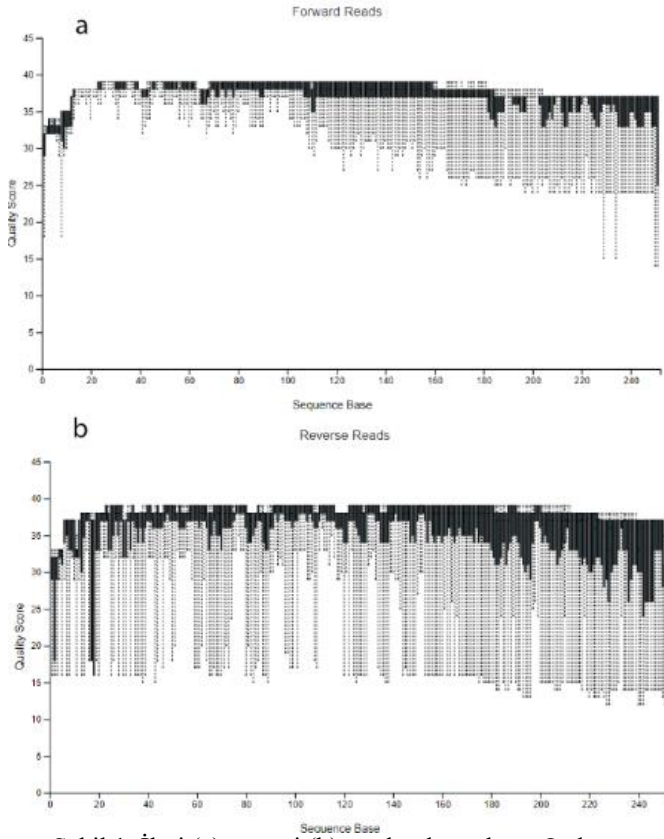
16S rRNA genlerinin V3-V4 hiper-değişken bölgesinin bakteri ve arkelere özgü evrensel primerler kullanılarak PCR ile ampikon inşaları yapılmıştır. Kütüphane hazırlık aşamasında saflaştırma ve indeks primerler ile PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kütüphane, dizileme öncesi son konsantrasyonu 10 pM olarak ayarlanmıştır. Illumina Miseq platformunda, 2 x 250 bp ileri ve geri yönlü okumalar (pair-end) olacak şekilde okunmuştur.

B. Biyoinformatik Analizler

Dizilerin kalite skorlarının kontrol edilmesi amacıyla FastQC v0.11.5 kullanılmıştır. FastQC profiline dayalı olarak ham dizi okumalarından adaptörler ve kalitesiz okumaları/dizileri çıkarmak için Trimmomatic-0.33 programı kullanılmıştır [10]. Bu aşamadan sonraki biyoinformatik analizler çoğu QIIME2 [11] pipeline ile gerçekleştirilmiştir. Kimerik dizilerin uzaklaştırılması QIIME2 içerisinde yer alan DADA2 eklentisi [12] ile yapılmıştır. Sonrasında Moleküler Operasyonel Taksonomik Birimler (MOTUs) QIIME2 içerisinde yer alan VSEARCH [13] kullanılarak belirlenmiştir. Bu MOTUlerin taksonomik statüleri *Silva v138 veritabanı* referans alınarak %97 benzerlik oranına göre oluşturulmuştur. İstatistiksel R v 4.1.2 [14] programı ile gerçekleştirilmiştir.

III. BULGULAR

Dizileme sonucu ileri ve geri yönlü olmak üzere 20.058 kısa okuma elde edilmiştir. Analiz sonucu okumaların her iki yönlü başarıyla elde edildiği ve kalite skorlarının Q30-Q40 değerleri aralığında olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. İleri (a) ve geri (b) yönlü okumaların Q skoru grafikleri.

Biyoinformatik analizler sonucunda toplam 25 farklı MOTU'ye ait 7338 dizi elde edilmiştir. Elde edilen her bir DNA dizisinin tanımlanması için Silva v138 veri tabanı kullanılmıştır.

Tablo 1. QIIME2 analizleri sonucunda *X. prolongata* türünün bağırsağında tanımlanan bakteri cinslerinin oranları ve ait oldukları şubeler.

Şube	Cins	Oran
Proteobacteria	<i>Sodalis</i>	91,52
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	2,28
Proteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	0,40
Actinobacteriota	<i>Corynebacterium</i>	0,40
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0,37
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	0,25
Actinobacteriota	<i>Cutibacterium</i>	0,23
Firmicutes	<i>Clostridia_UCG-014</i>	0,08
Bacteroidota	<i>Prevotella</i>	0,07

Takson atama analizleri sonucunda tanımlanan bakterilerin çoğunluğunun (yaklaşık %94,5) Proteobacteria şubesine ait oldukları anlaşılmıştır (Tablo 1). Bağırsak florasının çoğunluğunu ise *Sodalis* cinsine ait bakteriler oluşturmaktadır. Tanımlanamayan dizilerin oranları ise %4,42 olarak bulunmuştur (Tablo 1'de gösterilmemiştir).

IV. TARTIŞMA

Konakçılarının dokularını işgal eden bakteriyel böcek endosimbiyontları, birçok böcek taksonunda yaygındır [15]. Bu tür ortak yaşamın doğası, bakteriyel simbiyontun ekolojisine bağlı olarak parazitlik, mutualizm veya komensalizm şeklini alabilir. *Sodalis* cinsine ait bakteriler sıklıkla çalışılmış böcek endosimbiyontları olarak bilinmekle birlikte serbest yaşayan türleri de bulunmaktadır. *Sodalis*, çeçe sineği bağırsağında biyofilmler oluşturur ve bu işlem, yüzeye maruz kalan bakteriyel dış zar proteini A'nın (OmpA) varlığına bağlıdır. *Sodalis* endosimbiyontları, kan emici Diptera [16], Phthiraptera [17], özsu emici Hemiptera [18] ve Coleoptera [19] gibi beslenme açısından kısıtlı diyetlere sahip diğer böceklerde bulunur. Böylece birden fazla *Sodalis* türü, konakçıları içinde tanımlanmış ve konakçıya gerekli vitaminleri sağladığı gösterilmiştir [17], [19]. Aynı zamanda bazı *Sodalis* türü bakterilerin ikincil endosimbiyoz olduğu da gösterilmiştir [20]. *X. prolongata* bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %92'lik kısmını kapsayan *Sodalis* cinsi bakterilerinin içerisinde hem birincil hem de ikincil endosimbiyontların olması olası görünmektedir.

Çalışma kapsamında bağırsak florasında bulunan ikinci yaygın bakteri *Sphingomonas* olarak belirlenmiştir. İnsektisitleri parçalayan *Pseudomonas*, *Sphingomonas* ve *Achromobacter* tarımsal alanlardan tekrar tekrar izole edilmiştir. B bakteriler böcek ilacı uygulamasından sonra bağırsak simbiyontları olarak böcekler tarafından çok hızlı bir şekilde yakalanabilir [21]. İnsektisit parçalama yeteneğine sahip böcek bağırsağından türetilen *Pseudomonas*, elma kurdundan izole edilmiştir [22].

V. SONUÇLAR

X. prolongata türünün bağırsak mikroflorasının 16S metabarkotlama analizleri sonucunda dört farklı şubeye (Proteobacteria, Actinobacteriota, Firmicutes ve Bacteroidota) ait bakteri türlerinin varlığı ortaya konulmuştur. Bağırsak mikroflorasının *Sodalis* cinsi tarafından domine edildiği anlaşılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya yaptıkları katkılarından dolayı EBRG (Evolutionary Bioinformatics Research Group) ekibine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] A. Taeger, A.D. Liston, M. Prous, E.K. Groll, T. Gehroldt, S.M. Blank, "ECatSym – Electronic World Catalog of Symphyta (Insecta, Hymenoptera). Program version 5.0 (19 Dec 2018), data version 40 (23 Sep 2018). – Senckenberg Deutsches Entomologisches Institut (SDEI), Müncheberg. <https://sdei.de/ecatsym/> Access: 13 Mar 2023." 2018.
- [2] D.R. Smith, "Xiphydria prolongata (Geoffroy) (Hymenoptera: Xiphydriidae) adventive in North America," *Proceedings- Entomological Society of Washington* vol. 85, pp. 860–861, Jan. 1983.
- [3] F.S. Özyay, "The Harmful Insects on Willows in Marmara Region," *Teknik Bulten*, no. 183, Poplar and Fast Growing Forest Trees Research Institute, Ismit: 1-150, 1997.
- [4] R.B. Benson, "Handbooks for the Identification of British Insects. Hymenoptera, Symphyta" *Royal Entomological Society*, vol. 6, section 2(a-c), London. 1952.
- [5] S. Pažoutová, P. Šrůtka, J. Holuša, M. Chudíčková, M. Kolařík, "Diversity of xyleriaceous symbionts in Xiphydria woodwasps: role of vector and a host tree" *Fungal Ecology*, vol. 3(4), pp. 392-401, 2010.
- [6] B. Whittome, R.I. Graham, D.B. Levin, "Preliminary examination of gut bacteria from Neodiprion abietis (Hymenoptera: Diprionidae) larvae", *Population Ecology*, vol. 138, pp. 49-63, 2007.
- [7] H. Li, F. Medina, S.B. Vinson, C.J. Coates, "Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (Solenopsis invicta) midgut," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 89, pp. 203–209, 2005.
- [8] C.J. Mason, "Complex relationships at the intersection of insect gut microbiomes and plant defenses," *J Chem Ecol*, vol. 46, pp. 793–807, 2020.
- [9] Mason, C.J., "Complex Relationships at the Intersection of Insect Gut Microbiomes and Plant Defenses", *J Chem Ecol.*, 46, 793–807 (2020).
- [10] A. M. Bolger, M. Lohse, & B. Usadel, "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data", *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120, 2014.
- [11] E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, & J. G. Caporaso, "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2", *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857, 2019.
- [12] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, & S. P. Holmes, "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data", *Nature methods*, 13(7), 581-583, 2016.
- [13] T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, & F. Mahé, "VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics", *PeerJ*, 4, e2584, 2016.
- [14] R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [15] J. I. Perlmutter, and S. R. "Bordenstein, Microorganisms in the reproductive tissues of arthropods", *Nat. Rev. Microbiol.*, 18, 97–111, 2020.
- [16] E. Nováková, and V. Hypša, "A new Sodalis lineage from bloodsucking fly Craterina melbae (Diptera, Hippoboscoidea) originated independently of the tsetse flies symbiont Sodalis glossinidius", *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 131–135, 2007.
- [17] B. M. Boyd, J. M. Allen, R. Koga, T. Fukatsu, A. D. Sweet, K. P. Johnson, & D. L. Reed, "Two bacterial genera, Sodalis and Rickettsia, associated with the seal louse Proechinophthirus fluctus (Phthiraptera: Anoplura)", *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3185-3197, 2016.
- [18] N. Kaiwa, T. Hosokawa, Y. Kikuchi, N. Nikoh, X. Y. Meng, N. Kimura, et al., "Primary gut symbiont and secondary, Sodalis-allied symbiont of the scutellerid stinkbug Cantao ocellatus", *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 3486–3494, 2010.
- [19] A. Heddi, A. M. Grenier, C. Khatchadourian, H. Charles, and P. Nardon, "Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and Wolbachia", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6814–6819, 1999.
- [20] S. Grünwald, M. Pilhofer, and W. Höll. "Microbial associations in gut systems of wood-and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]." *Systematic and Applied Microbiology*, 33.1 (2010): 25-34.
- [21] V. S. Dexter, R. "Boopathy, Biodegradation of phenol by Acinetobacter tandoii isolated from the gut of the termite", *Environ Sci Pollut Res.*, 2019;26:34067–72.
- [22] M. G. Boush, F. Matsumura, "Insecticidal degradation by Pseudomonas melophthora, the bacterial symbiote of the apple maggot", *J Econ Entomol.*, 1967;60:918–20.