مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۶۹-۱۶۲

Original Article

ردیابی و تعیین جایگاه تاکسونومیک باکتری همزیست *ولباکیا* در کرم گلوگاه انار در استان فارس

آیدا پیوستگان[۱]، علی پاک نیت*[۲]، هادی استوان[۳]، مرتضی الهیاری[۲]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس، گروه حشره شناسی، [۲] استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرقان، [۳] استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس، گروه حشره شناسی

چکیده

سابقه و هدف: کرم گلوگاه انار، لارو شب پره *اکتومیلویس سراتونیا* می باشد که از مهم ترین آفات انار محسوب می گردد. در حال حاضر هر گونه عملیات سم پاشی بر علیه این آفت فاقد نتیجه بود است. یکی از روش های کنترل استفاده از عوامل بیولوژیک مانند ایجاد تغییرات تولید مثلی توسط باکتری *ولباکیا* است. این مطالعه با هدف ردیابی باکتری همزیست *ولباکیا* در کرم گلوگاه انار و تعیین جایگاه تاکسونومیکی آن در استان فارس انجام شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش به صورت تصادفی ۱۰۰ نمونه از انارهای آلوده مناطق مختلف استان فارس جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA از تخمدان حشره، به منظور ردیابی و وجود باکتری همزیست ولباکیا از روش PCR استفاده شد. پس از تعیین توالی قطعه حاصل و مقایسه آن با توالی های موجود در بانک ژن جهانی، جایگاه تاکسونومیکی *ولباکیا* با استفاده از نرم افزارهای ClustalX و TreeView تعیین گردید.

یافته ها: در این مطالعه تنها یک جمعیت از شیراز آلودگی به *ولباکیا* را نشان داد. پس از تکثیر ژن *wsp*، محصول یک قطعه ۵۱۳ جفت بازی بود که به دنبال تعیین توالی با شماره دسترسی KF007903 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. با مقایسه توالی به دست آمده و توالی موجود در بانک ژنی مشخص گردید که این باکتری در زیر گروه Fur8 از گروه B متعلق به *ولباکیا* پیپینتیس قرار دارد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر اولین گزارش وجود *ولباکیا* در کرم گلوگاه انار در ایران و جهان می باشد. از آنجایی که نمونه برداری در فاصله زمانی تیر تا شهریور ماه انجام پذیرفته است، بنابراین شیوع کم باکتری *ولباکیا* در مناطق مورد بررسی را می توان به احتمال اثر دما به عنوان یک عامل بازدارنده رشد باکتری در حشرات نسبت داد.

واژگان کلیدی: کرم گلوگاه انار، *ولباکیا*، ژن *wsp*، تاکسونومی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۲

مقدمه

کرم گلوگاه انار، لارو شب پره *اکتومایولیس سراتونیا* (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller) از خانواده پایرالیده (Pyralidae) و زیر خانواده فایکتین (Phyctinae) است و از مهمترین آفات انار در استان فارس و سایر مناطق کشور محسوب می گردد. این حشره یک آفت پلی فاژ بوده و در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنده می باشد. لارو این شب پره بر روی انار و میوه های خشک مانند انجیر، پسته، بادام و خرما فعالیت می کند (۱). مبارزه شیمیایی بر علیه این آفت مقرون به صرفه نمی باشد. از طرف دیگر این آفت تخم های خود را بین پرچم ها قرار داده و

*) آدرس برای مکاتبه: فارس، زرقان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس.
تلفن: ۰۷۱۲-۴۲۲۲۴۳۰ پست الکترونیک: pakniat@farsagres.ir

Archive of SID
www.SID.ir

لارو ها پس از ورود مستقیم به میوه، تمام دوره لاروی خود را در آن سپری می کنند. این امر موجب می شود که عملیات سمپاشی تاثیر چندانی نداشته باشد.

مبارزه مکانیکی (جمع آوری میوه های آلوده و سوزاندن آن ها) تا حدی از میزان خسارت می کاهد. یکی از روش های جدیدی که شاید بتوان برای کنترل جمعیت این آفت بکار برد، احتمال ایجاد تغییرات تولید مثلی توسط باکتری همزیست *ولباکیا* (*Wolbachia*) در بدن آفت می باشد.

ولباکیا باکتری رایج در بافت تولید مثلی بندپایان است. این باکتری گرم منفی و از خانواده *ریکتسیا* می باشد. *ریکتسیا*ها، باکتری های پارازیتی هستند که عموماً با بافت های میزبان ارتباط نزدیکی داشته و اغلب نمی توان آن ها را خارج از سلول های میزبان کشت داد. اعضا این خانواده متعلق به زیر گروه آلفا–پروتئوباکتری ها (α-proteobacteria) می باشند و عموماً در بندپایان یافت می شوند. انتقال آن ها از طریق سیتوپلاسم تخم بوده و در بافت های تولید مثلی حشرات مانند بیضه و تخمدان فعالیت می کنند (۲ و ۳).

این باکتری می تواند بسته به نوع میزبان، تغییرات تولید مثلی مختلفی را شامل: ناسازگاری سیتوپلاسمی (Cytoplasmic incompetibility) بین سویه ها و گونه های نزدیک، مونث سازی (Feminization)، نرکشی (Male-killing)، القا بکرزایی (Thelytokous) و افزایش میزان زاد آوری در میزبان (Fecondity) ایجاد نماید. از این میان بیشترین تغییراتی که تاکنون در حشرات مشاهده شده ناسازگاری سیتوپلاسمی است. این تغییرات تولید مثلی انتخابی در میزبان، یک مزیت برای باکتری به حساب می آید (۲، ۴ و ۵).

ناسازگاری سیتوپلاسمی در بسیاری از گونه های حشرات (۸-۶)، بکرزایی (Thelytokous) در گونه های هزارپایان و زنبورهای پارازیت (۷، ۹ و۱۰)، نرکشی در بعضی از حشرات از جمله کفشدوزک و پروانه (۱۱) مشاهده شده است. *ولباکیا* بر اساس ژن های *16S rRNA*، *ftsz* و *wsp* به ۶ دسته (A-F) تقسیم می گردد. از این میان اعتبار دسته های A و B که حشرات را آلوده می کنند به طور کامل تایید شده است. ژن *wsp* پروتئین لایه خارجی باکتری *ولباکیا* را کد می نماید. از طرفی رشد تکاملی این ژن نسبت به سایر ژن های *ولباکیا* بیشتر است و تفکیک فیلوژنیک بر اساس این ژن بهتر می باشد. بنابراین در این مطالعه از این ژن استفاده گردید.

هدف از این مطالعه ردیابی باکتری همزیست *ولباکیا* در کرم گلوگاه انار و نیز تعیین جایگاه تاکسونومیکی آن در استان فارس بود تا بتوان از این باکتری به عنوان یک عامل بیولوژیک در کنترل این آفت استفاده نمود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری از باغ و پرورش کرم گلوگاه انار در شرایط آزمایشگاه: در این مطالعه از تیر ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۰ به طور میانگین ۱۰۰ نمونه از انارهای آلوده مناطق مختلف استان فارس به صورت تصادفی از روی درختان و زیر درختان جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

لاروهای سنین مختلف کرم گلوگاه از میوه های آلوده جداسازی شدند و بر روی غذای مصنوعی شامل ۶۰۰ گرم سبوس گندم، ۲۳ گرم مخمر، ۱/۳ گرم متیل پارابن، ۱۲۰ گرم سوکروز، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۵۰ میلی لیتر گلیسیرین تا زمان بلوغ قرار گرفتند. شرایط نگهداری شامل دمای ۲۶ درجه سلیسیوس، رطوبت ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود (۱۲).

ب) استخراج DNA از تخمدان حشره: تخمدان ها به طور کامل در هاون مخصوص هموژنایزر، یکنواخت گردیدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ g قرار داده شدند تا DNA رسوب نماید. در ادامه با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت (Igenomic DNA Extraction) کره جنوبی، DNA استخراج گردید. DNA ی تخمدان های زنبورهای تریکوگراما با همین روش استخراج و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

ج) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن *wsp* از آغازگرهای Wsp-F (81F) (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC3') و Wsp-R

Archive of SID
www.SID.ir

(691R) (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3') استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA (۸۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (۸۰ میلی مولار)، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs، یک میکرولیتر (۱۰میلی مولار) از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase (سینا ژن، ایران) و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد (۱۳).

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. سپس با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مدل Gbox مورد بررسی قرار گرفتند.

د) تعیین توالی ژن wsp و تعیین جایگاه تاکسونومیکی حشره: محصولات PCR با استفاده از کیت، خالص سازی و به منظور تعیین توالی به کره جنوبی (شرکت BioNeer) فرستاده شدند. توالی های به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن جهانی مطابقت داده شدند (جدول ۱).

ه) آنالیز آماری: در این مطالعه با استفاده از نرم افزارهای DNA star، ClustalX و TreeView جایگاه تاکسونومیکی *ولباکیا* تعیین گردید.

یافته ها

الف) ردیابی باکتری با استفاده از روش PCR: نتایج ارزیابی مولکولی نشان داد که در بین جمعیت های جمع آوری شده کرم گلوگاه از مناطق مختلف استان فارس، تنها یک جمعیت از شیراز به باکتری *ولباکیا* آلوده بود (شکل ۱).

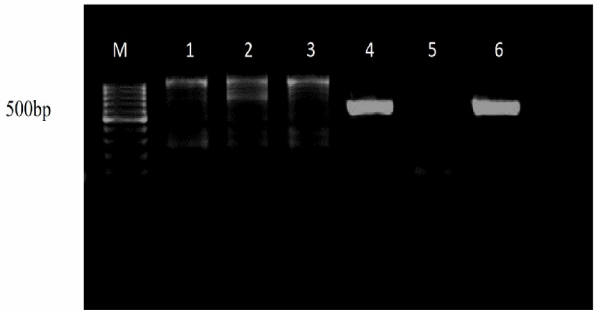
ب) تعیین توالی ژن wsp: پس از تکثیر ژن *wsp*، محصول یک قطعه ۵۱۳ جفت بازی بود که به دنبال تعیین توالی با شماره دسترسی KF007903 در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

توالی های به دست آمده از ژن *wsp* سویه ولباکیای حاصل از کرم گلوگاه با توالی های موجود در بانک جهانی ژن مطابقت داده شدند و درصد شباهت کرم گلوگاه مشخص گردید (جدول ۱).

نتایج نشان داد که سویه *ولباکیای* کرم گلوگاه انار به میزان ۹۸/۲ درصد به سویه های موجود در کنه دو نقطه ای (*Tetranychus urtica*) و ۹۸/۲ درصد به پروانه های جنس *استرینیا* (*Ostrinia sp*) شباهت داشته و به گونه *ولباکیا پیپینتیس* (*Wolbachia pipientis*) تعلق دارد (شکل ۲).

بحث

بر اساس بررسی هایی که به منظور ردیابی باکتری *ولباکیا* به عنوان مهمترین عامل ایجاد تغییرات تولیدمثلی در کرم گلوگاه انار صورت گرفت، تنها باند ایجاد شده یک باند ۵۱۳ جفت بازی بود. به طوری که با باند تریکوگرامایی که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت به کار رفته بود، همخوانی داشت. بر اساس تعیین توالی *ولباکیای* موجود در کرم گلوگاه انار، این باکتری از گونه *ولباکیا پیپینتیس* می باشد. *ولباکیا پیپینیس* جز بالا گروه B *ولباکیا* محسوب می شود و در بسیاری از بندپایان



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *wsp* در جمعیت های مختلف کرم گلوگاه انار منطقه شیراز. M) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون های ۱، ۲، ۳ و ۶) جمعیت های کرم گلوگاه جمع آوری شده از مناطق مختلف شیراز، ستون ۴) جمعیت کنترل مثبت (زنبورهای تریکوگراما)، ستون ۵) کنترل منفی (آب مقطر استریل).

Archive of SID
www.SID.ir

از جمله حشرات، کنه ها و خرچنگ ها یافت شده است (۱۳ و ۱۴). *ولباکیای* موجود در کرم گلوگاه انار بر اساس دندروگرام رسم شده در گروه Fur8 قرار گرفت. این گروه از بالا گروه B باکتری *ولباکیا* می باشد و همچنین شباهت زیادی به *ولباکیای* موجود در کنه های دو نقطه ای و پروانه های جنس *استرینیا* (*Ostirinia sp*) دارد (جدول ۱ و شکل ۲).

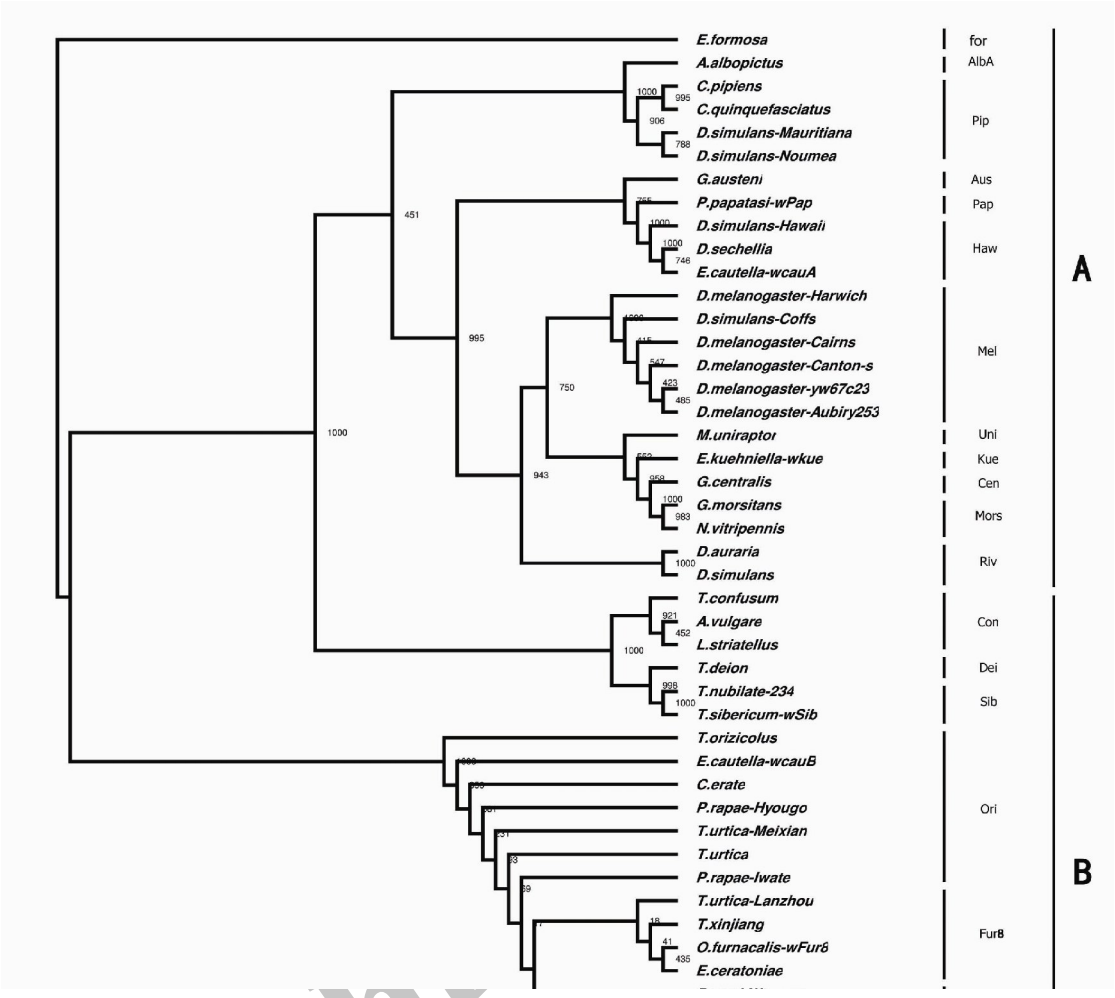
این یافته با نتایج به دست آمده توسط توماس و بلندفورد (Thomas & Blanford) در سال ۲۰۰۳ و موتون (Mouton) در سال ۲۰۰۶ مشابهت دارد (۱۷-۱۵). همچنین آنها اعلام داشتند که علاوه بر تاثیر ژنتیکی عوامل میزبان و همزیست، عوامل محیطی نیز می توانند بر روی تراکم باکتری تاثیر بگذارند.

از این میان، دما در موجودات خونسرد از اهمیت ویژه ای

جدول ۱: اطلاعات و شماره بانک ژن قطعات تکثیر شده از ناحیه *wsp* باکتری *ولباکیا* مورد استفاده در این تحقیق و درصد شباهت آن ها با توالی به دست آمده از کرم گلوگاه انار.

میزبان	گروه های *ولباکیا*	شماره دسترسی	درصد شباهت
ادس البوپیکتوس (*Aedes albopictus*)	AlbA (آلبا)	AF020059	٪۷۸/۲
ارمادیلیوم ولگار (*Armadillium vulgare*)	Con (کن)	AJ276617	٪۷۹/۹
کولیس اریت (*Colias erate*)	Ori (اری)	AB094379	٪۹۸/۱
کولکس پیپینس (*Cx. pipiens*)	Pip (پیپ)	AF020061	٪۷۷/۸
کولکس کئینکوفسیتوس (*Cx. quinquefasciatus*)	Pip (پیپ)	AF020060	٪۷۷/۸
درسافیلا ارایا (*D. auraria*)	Riv (ریو)	AF020062	٪۷۶/۴
درسافیلا ملانوگاستر (*D. melanogaster(Aubiry253)*)	Mel (میل)	AF020063	٪۷۵
درسافیلا ملانوگاستر (*D. melanogaster(Cairns)*)	Mel (میل)	AF020064	٪۷۴/۹
درسافیلا ملانوگاستر (*D. melanogaster(Canton-s)*)	Mel (میل)	AF020065	٪۷۵
درسافیلا ملانوگاستر (*D. melanogaster(Harwich)*)	Mel (میل)	AF020066	٪۷۴/۵
درسافیلا ملانوگاستر (*D. melanogaster(yw67c23)*)	Mel (میل)	AF020072	٪۷۵
درسافیلا شلیلا (*D. sechellia*)	Haw (ها)	AF020073	٪۷۵/۶
درسافیلا سیمولنس (*D. simulans(Coffs)*)	Mel (میل)	AF020067	٪۷۷/۲
درسافیلا سیمولنس (*D. simulans(Hawaii)*)	Haw (ها)	AF020068	٪۷۵/۶
درسافیلا سیمولنس (*D. simulans(Mauritiana)*)	Pip (پیپ)	AF020069	٪۷۸/۴
درسافیلا سیمولنس (*D. simulans(Noumea)*)	Pip (پیپ)	AF020074	٪۷۸/۴
افستیا کائیتیلا (*E. cautella(wcauA)*)	Haw (ها)	AF020075	٪۷۵/۸
افستیا کوهنیلا (*E. kuehniella*)	Kue (کو)	AF071911	٪۷۵/۶
اکتومایولیس سراتونیا (*Ectomyelois ceratoniae*)	Fur8 (فور ۸)	KF007903	٪۱۰۰
انکارسیا فورموسا (*Encarsia formosa*)	For (فور)	AF071918	٪۸۸/۳
افستیا کائتیلا (*E. cautella(wcauB)*)	Ori (اری)	AF020076	٪۹۷/۵
گلوسینا انستنی (*Glossina austeni*)	Aus (اس)	AF020077	٪۷۹/۵
گلوسینا سنترالیس (*G. centralis*)	Cen (سن)	AF020078	٪۷۵/۲
گلوسینا مورسیتنس (*G. morsitans*)	Mors (مورس)	AF020079	٪۷۵/۶
لاودلفاکس استریاتلوس (*Laodelphax striatellus*)	Con (کن)	AF020080	٪۸۳/۴
موسیدیفوراکس یونیراپتور (*Muscidifurax uniraptor*)	Uni (یونی)	AF020071	٪۷۶/۲
ناسونیا ویتریپنیس (*Nasonia vitripennis*)	Mors (مورس)	AF020081	٪۷۵
استرینیا فورناکالیس (*Ostrinia furnacalis*)	Fur8 (فور ۸)	GU166595	٪۹۸/۲
فلوبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*)	Pap (پاپ)	AF020082	٪۷۷/۲
پایریس رپا (*Pieris rapae(Hyougo)*)	Ori (اری)	AB094373	٪۹۸/۲
پایریس رپا (*Pieris rapae(Iwate)*)	Ori (اری)	AB094374	٪۹۸/۲
ترانیکوس ارتیکا (*T.urtica(Lanzhou)*)	Fur8 (فور ۸)	AY785374	٪۹۸/۲

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: دندروگرام حاصل از تطابق نوکلوتیدی جدایه ترادف یابی شده از استان فارس با ترادف مشابه در ۴۰ گونه حشره از بانک ژن جهانی بر اساس ترادف نوکلوتیدی ژن *wsp* که توسط برنامه CulstalX هم ردیف سازی و به کمک برنامه Tree view به نمایش در آمده است. در این مطالعه قطعه *ولباکیا* در حشره *E. Formosa* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

برخوردار است و در مجموع بر روی برهم کنش میزبان- همزیست تاثیر دارد.

پراکاش و پوتاراج (Prakash و Puttaraju) در سال ۲۰۰۷ تاثیر دما و رطوبت بر میزان تراکم باکتری در درون یک جمعیت حشره را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که دمای بالاتر از ۳۰ درجه سلیسیوس به شدت موجب از بین رفتن این باکتری می شود (۲).

این یافته تا حدودی نتایج به دست آمده از این تحقیق در خصوص یافت شدن این باکتری تنها در یک جمعیت (شیراز) کرم گلوگاه انار را تایید می کند. تراکم باکتری یک عامل کلیدی در رابطه میزبان- همزیست است. زیرا هم بر روی بازده انتقال و هم توانایی باکتری در ایجاد آلودگی تاثیر می گذارد (۷).

با توجه به دندروگرام حاصل و از آنجایی که پروانه های جنس *استرینیا* و کرم گلوگاه انار از خانواده پایرالیده هستند، این احتمال وجود دارد که این باکتری در کرم گلوگاه انار اثراتی مشابه اثرات ایجاد شده در پروانه های جنس *استرینیا* ایجاد نماید. برهمکنش بین ژنوتیپ های میزبان- باکتری و ترکیبی از عوامل محیطی و فیزیولوژیکی تعیین کننده اثرات منفی یا مثبت باکتری بر روی میزبان خود می باشند.

فرخی (Farrokhi) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که زنبورهای دو سوش آلوده به *ولباکیا* و غیرآلوده *تریکوگراما براسیکا* (*T. brassicae*) از نظر قدرت

www.SID.ir

جستجوگری مشابه هستند. همچنین پارازیتیسم سویه آلوده به *ولباکیا* و غیر آلوده *تریکوگراما آتوپوویریلا* (*T. atopovirilia*) روی تخم‌های *افستیا کوهینیلا* (*E. kuehniella*) تفاوت معنی داری نداشت (۱۸).

سینکینز (Sinkins) و همکاران در سال ۱۹۹۷ اعلام داشتند که *ولباکیا* می تواند به عنوان یک عامل ژنتیکی کنترل آفات به کار رود (۱۹). از باکتری *ولباکیا* می توان به منظور کنترل آفاتی مانند سوسک های آرد، شب پره آرد، سرخرطومی آلفا، زنجره درختی، مگس های میوه و پشه آنوفل استفاده نمود.

در مطالعه حاضر برای اولین بار در دنیا وجود باکتری *ولباکیا* در کرم گلوگاه انار به اثبات رسید و امید تازه ای برای استفاده از آن در کنترل این آفت کلیدی انار ایجاد گردیده است.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه تنها در یک جمعیت کرم گلوگاه، باکتری *ولباکیا* ردیابی شد می توان این طور توجیه نمود که میزان شیوع *ولباکیا* در داخل جمعیت کرم گلوگاه کم است. از طرف دیگر از آنجایی که نمونه برداری ها در بازه زمانی تیر تا شهریور ماه انجام پذیرفته است، بنابراین احتمال اثر دما بر جمعیت باکتری می تواند یک عامل بازدارنده رشد باکتری در حشرات باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از اداره حفظ نباتات استان فارس و دانشگاه علوم تحقیقات فارس به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Behdad A. Pest of fruit trees of Iran. Esfehan. Publish of Neshat Esfehan; 1991 [In Persian]
2. Prakash BM, Puttaraju HP. Frequency of infection with A and B supergroup *Wolbachia* in insects and pests associated with mulberry and silkworm. J Biosci. 2007; 32: 671-676.
3. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomo. 1997; 42: 587-609.
4. Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the Culex pipiens. Mol Biol Evol. 2011; 28(10): 2761-2772.
5. Karimi J, Darsouei R, Hosseini M, Stouthamer R. Molecular. Characterization of Iranian Trichogrammatids (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and their *Wolbachia* endosymbiont. J Asia Pacific Ento. 2010; 15: 73-77.
6. Hughes GL, Allsopp PG, Brumbley SM, Woolfit M, Mc Graw A, O'Neill SL. Variable infection frequency and high diversity of multiple strains of *Wolbachia* pipientis in Perkinsiella plant hoppers. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(6): 2165.
7. Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL. Characterization of a new Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from culex pipiens (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2010; 47(2): 179-185.
8. Hunter M, Perlman S, Kelly S. A bacterial symbiont in the bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wsp *Encarsia pergandiella*. Royal Society. 2003; 270: 2185-2190.
9. Floate K, Kyei poku G, Coghlin P. Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol Science and Technology; 2006.

Archive of SID
www.SID.ir

10. Paraskevopoulos NLO, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Sys Evol. Microb. 2007; 57: 654-657.

11. Hoy MA, Jeyaprakash A. Microbial diversity in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari:Phytoseiidae) and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Biol Cont. 2005; 32: 427-441.

12. Tabatabaifard J. 2011. Comparing of the artificial diets for mass-rearing of Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zell. and evaluation of the gamma ray doses for male sterility under laboratory condition. M.Sc. Vali-e-Asr University of Rafsanjan faculty of Agriculture Department of plant protection.

13. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Rev Microbiol. 2008; 6: 741-751.

14. Jeyaprakash A, Hoy MA. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol Biol. 2000; 9: 393- 405.

15. Thomas MB, Bladford S. Thermal biology in insect-parasite interactions. Trends Ecol Evol. 2003; 18: 344-350.

16. Mouton L, Henri H, Boule´treau M, Vavre F. Multiple infections and diversity of cytoplasmic incompatibility in a haplodiploid species. Heredity. 2005; 94: 187-192.

17. Mouton L, Henri H, Boule´treau M, Vavre F. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. Parasitol. 2006; 132: 49-56.

18. Farrokhi S, Ashouri A, Shirazi J, Allahyari H, Huigens ME. A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wsp *Trichogramma brassicae*. CORD Conference Proceedings. 2010; 10: 167-167. [In Persian]

19. Sinkins SP. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 2004; 34: 723-729.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

Detection of *Wolbachia* sp. in *Ectomyelois ceratoniae* and determination of its taxonomical place in Fars province

Aida Peyvastegan [1], Ali Pakniat [2], Hadi Ostovan [3], Morteza Allahyari [2]

[1] MS.c., Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[2] Assistant Professor, Fars Research Center for Agricultural and Natural Resources, Zarghan branch, Fars, Iran.
[3] Professor, Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Ectomyelois ceratoniae* is one of the main pests of pomegranate. By now, no pesticides showed efficient effects on this pest. Biological control, such as changes in the reproduction ability, is a new emerged strategy for control of the population of this pest. This study was aimed to identify the symbiont bacteria in *Ectomyelois ceratoniae* and to determine their taxonomic classification.

Materials & Methods: In this study, totally 100 infected pomegranate were randomly collected from different parts of Fars providence. After DNA extraction from ovum of the insects, a PCR approach was used to identify any symbiont bacteria in this samples. Following sequencing of the products and their analysis on gene banks, the taxonomic classification of *Wolbachia* was determined using ClusalX and TreeView.

Results: In this study only one sample collected from shiraz was contaminated to *Wolbachia* . After amplification of *wsp* gene, OCR produced a 513 bp fragment which is available in gene bank under accession number KF007903. Analysis of the fragment in gene bank showed that this bacterium belonged to subclass Fur8 from group B, referred to as *Wolbachia pipientis.*

Conclusion: According to our knowledge, the present study is the first report of the presence of *Wolbachia* in *E. ceratoniae.* Since the sampling were performed through June to August, the low prevalence of the bacterium *Wolbachia* sp. in these area can be due to effects of temperature, which is an inhibitory factor for growth of the bacterium in the insect.

Keywords: *Ectomyelois ceratoniae, Wolbachia*, *wsp* gene, Taxonomic.

Correspondence to: Ali Pakniat

Tel: +987124222430

E-mail: pakniat@farsagres.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 162-169.

Archive of SID

www.SID.ir