Journal of Entomological Society of Iran
https://jesi.areeo.ac.ir
Entomological Society of Iran
2024, 44 (1), 1-10
Research Article
https://doi.org.10.61186/jesi.44.1.1
pISSN: 0259-9996
eISSN: 2783-3968
OPEN ACCESS

همزیست‌های اجباری و اختیاری در جمعیت‌های مختلف سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae)

مرضیه کشکولی[۱و۲] و جهانگیر خواجه‌علی [۱]

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- پژوهشکده زیست‌فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
✉ mkashkouli@iut.ac.ir https://orcid.org/0000-0001-5011-6261
✉ khajeali@iut.ac.ir https://orcid.org/0000-0002-3042-028X

چکیده: سفیدبالک گلخانه، *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) یکی از آفت‌های زیان‌آور سبزیجات و گیاهان زینتی می‌باشد. خسارت زیاد این آفت باعث شده تا طراحی برنامه‌های تلفیقی مدیریت آفات (IPM) بر مبنای زیست‌شناسی و روابط همزیستی آن ضروری به‌نظر برسد. از آنجایی که همزیست‌های سفیدبالک گلخانه تاکنون در ایران کمتر شناخته شده‌اند، در پژوهش پیش‌رو تنوع آن‌ها در جمعیت‌های مختلف سفیدبالک گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، نمونه‌برداری از گلخانه‌ها و مزارع آلوده‌ی مناطق مختلف استان اصفهان انجام شد. سپس برای شناسایی مولکولی گونه‌ی سفیدبالک گلخانه و ارزیابی وجود یا عدم وجود گونه‌های مختلف همزیست، استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) و در نهایت توالی‌یابی ژن‌ها انجام شد. همچنین، در مراحل مختلف از سفیدبالک پنبه، *Bemisia tabaci* (Gennadius)، به‌عنوان شاهد استفاده شد. گونه مورد نظر از لحاظ ریخت‌شناسی و توالی ژن سیتوکروم اکسیداز یک (*COI*) به‌عنوان *T. vaporariorum* شناسایی شد. بررسی تنوع همزیست‌ها نشان دادند که همزیست‌های *Portiera* sp. و *Arsenophonus* sp. در تمام جمعیت‌های جمع‌آوری شده وجود داشتند. *Hamiltonella* sp. و *Rickettsia* sp. در تمام جمعیت‌ها به‌غیر از جمعیت‌های خولنجان و باغ‌ابریشم ردیابی شدند. *Cardinium* sp. در جمعیت یفران مشاهده شده و *Fritschea* sp. در جمعیت‌های خمینی‌شهر، نسیم‌آباد، باغ ابریشم، خولنجان و یفران شناسایی شدند، درحالی‌که باکتری *Wolbachia* در هیچ‌کدام از جمعیت‌ها ردیابی نشد. با توجه به کمبود اطلاعات در مورد تنوع همزیستی سفیدبالک گلخانه و همچنین نبود مطالعه‌ای در ایران، این پژوهش می‌تواند مبنایی برای مطالعات تکمیلی در زمینه‌ی همزیستی و شناخت نقش همزیست‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های همزیست ، سیتوکروم اکسیداز یک (*COI*)، *Arsenophonus*، *Portiera*

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸
دبیر تخصصی: ریحانه درسویی

Citation: Kashkouli, M. & Khajehali, J. (2024) Obligate and facultative symbionts in different populations of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae) *J. Entomol. Soc. Iran* 44 (1), 1-10.

مقدمه

ارتباط و برهم‌کنش میکروارگانیسم‌ها و حشرات در طبیعت بسیار شایع می‌باشد. از این نظر راسته نیم‌بالپوشان برای مطالعه تکامل و تنوع رابطه همزیستی دارای اهمیت هستند به این دلیل که تعدادی از حشرات این راسته وابسته به جیره‌ی غذایی خاصی چون شیره گیاهی، خون مهره‌داران یا بی‌مهرگان دیگر می‌باشند (Fukatsu & Hosokawa, 2002). همزیستی بین حشرات راسته نیم‌بالپوشان و باکتری‌های همزیست آن‌ها در سه زیرراسته‌ی Sternorrhyncha (شته‌ها، شپشک‌ها، سفیدبالک‌ها و پسیل‌ها)، Auchenorryhncha (زنجره‌ها و زنجرک‌ها) و Heteroptera (سن‌های حقیقی) اثبات شده است (Kashkouli *et al.*, 2019) که بر اساس زیست‌شناسی و تاریخچه تکاملی در سه حالت همزیستی اجباری (اولیه)، اختیاری (ثانویه) و همزیست‌های خارج سلولی در دستگاه گوارش وجود دارند (Sudakaran *et al.*, 2017). همزیست‌های اجباری با فراهم کردن مواد غذایی ضروری چون آمینواسیدها و ویتامین‌ها یا کمک به هضم و سم‌زدایی غذا و یا غنی‌سازی جیره‌های فقیر غذایی، نقشی برجسته در تامین غذایی حشره بازی می‌کنند (Dale & Moran, 2006؛ Haine, 2008؛ Engel & Moran, 2013؛ Ferrari & Vavre, 2011؛ Haine, 2008؛ Kashkouli *et al.*, 2021a, 2021c). همزیست‌های اختیاری به‌طور کلی برای زنده‌مانی میزبان ضروری نیستند (Dedeine *et al.*, 2001) بلکه می‌توانند اثراتی مهم و برجسته روی ویژگی‌های میزبان داشته باشند. از جمله این اثرات می‌توان به ایجاد تغییرات در ظرفیت تولیدمثلی، دفاع، تحمل دمایی یا تغذیه‌ی میزبان اشاره کرد (Kashkouli *et al.*, 2021c؛ Moran *et al.*, 2008؛ Ayoubi *et al.*, 2020). سومین گروه از همزیست‌ها، همزیست‌های خارج سلولی در دستگاه گوارش هستند که با فراهم کردن مواد غذایی، شکستن پلیمرهای گیاهی، تجزیه نیتروژن یا سم‌زدایی متابولیت‌های دفاعی گیاه در توانمندی میزبان نقش بازی می‌کنند (Kashkouli *et al.*, 2019a, 2019b, 2020, 2021b, 2021c؛ Sudakaran *et al.*, 2017؛ Karamipour *et al.*, 2016, 2021؛ Prado *et al.*, 2010).

Corresponding author: Marzieh Kashkouli (Email: mkashkouli@iut.ac.ir)
© 2024 by Author(s), Published by the Entomological Society of Iran
This Work is Licensed under Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International Public License.

سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) یکی از آفات زیان‌آور شناخته شده سبزیجات و گیاهان زینتی می‌باشد که از نظر اقتصادی و انتقال بیماری‌های ویروسی حائز اهمیت است (Watanabe *et al.*, 2018). این آفت دارای دوره رشد کوتاه بوده و تخم‌ریزی بالای آن سبب افزایش سریع جمعیت می‌شود. سفیدبالک گلخانه با تغذیه از شیره گیاهی موجب کاهش محصول شده و هر ساله خسارتی سنگین بر کیفیت و کمیت محصولات وارد می‌سازد (Bi *et al.*, 2002). همچنین تجمع قارچ‌های ساپروفیت روی عسلک مترشح شده از آن‌ها سبب کاهش کیفیت گیاه شده و می‌تواند بر کارایی دشمنان طبیعی و نیز آفات دیگر، اثرگذار باشد (Manzano & van Lenteren, 2009). امروزه برای مهار جمعیت سفیدبالک گلخانه از انواع سموم آفت‌کش در سطوح وسیع استفاده می‌شود، اما سرعت نمو و تولید مثل بالا در این حشره باعث افزایش سریع جمعیت آفت و نیاز مجدد به آفت‌کش می‌شود که استفاده از آن‌ها مشکلاتی چون بروز مقاومت در آفات، از بین رفتن دشمنان طبیعی، ایجاد گیاه‌سوزی، طغیان آفات ثانویه و آلودگی‌های زیست محیطی را در پی دارد (Choi *et al.*, 2003؛ Erdogan *et al.*, 2021). از سوی دیگر تغذیه، جفت‌گیری و تخم‌گذاری افراد بالغ و همچنین رشد و نمو پوره‌ها در سطح زیرین برگ‌ها انجام می‌گیرد که این مسئله کنترل شیمیایی این آفت را با مشکل مواجه کرده است (Choi *et al.*, 2003).

از نقطه‌نظر مدیریت آفات، مزیت همزیست‌های باکتریایی می‌تواند مدیریت گونه‌های آفتی باشد که سلامت انسان، کیفیت محیط‌زیست یا محصولات مهم را به‌طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهند. برخی رویکردهای عمده برپایه این میکروارگانیسم‌ها و باتوجه به نقش آنها در میزبان به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌کار گرفته شده‌اند (Engel & Moran, 2013). در حال حاضر و با توجه به مشکلات موجود در کنترل سفیدبالک گلخانه، طراحی برنامه تلفیقی مدیریت آفات بر مبنای زیست‌شناسی حشره ضروری به‌نظر می‌رسد و از آن‌جا که همزیست‌های حشرات بخش‌های مهمی از فعالیت‌های زیستی میزبان از جمله حساسیت به آفت‌کش‌ها، تحمل دمایی و دامنه میزبانی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، مطالعه تنوع و نحوه اثر آنها می‌تواند در مدیریت آفت بسیار مهمی چون سفیدبالک گلخانه اثرگذار باشد (Wang *et al.*, 2023؛ Siddiqui *et al.*, 2022؛ Dângelo *et al.*, 2021؛ Barman *et al.*, 2021؛ Liu *et al.*, 2020a؛ Trienens & Beukeboom, 2019؛ Su *et al.*, 2013).

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه میزبان. به‌منظور استقرار سفیدبالک‌ها در گلخانه، بذرهای خیار (بومی اصفهان) ابتدا در سینی‌های نشا و در انکوباتور با شرایط کنترل شده (دمای ۲۵±۲ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۵±۶۰٪) کاشته شدند. نشاها پس از پر کردن ریشه به‌ترتیب به گلدان‌های با قطر دهانه‌ی ۶ و ۱۰ سانتی‌متر انتقال یافتند و گلدان‌ها برای چندبرگی شدن در شرایط کنترل شده‌ی گلخانه (دمای ۲۵±۲ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۵±۶۰٪) نگهداری شدند.

جمع‌آوری سفیدبالک گلخانه. باتوجه به بروز آلودگی در مناطق مختلف استان اصفهان، نمونه‌برداری از اردیبهشت ۱۴۰۱ تا مرداد ۱۴۰۲ به‌طور متناوب از گلخانه‌ها و مزارع انجام شد. حشرات کامل سفیدبالک گلخانه توسط آسپیراتور جمع‌آوری شده و روی یخ و داخل یخدان به آزمایشگاه منتقل شدند. برگ‌های آلوده به مراحل نابالغ نیز بررسی شده و در صورت عدم آلودگی به آفت دیگر، از گلخانه‌ها جمع‌آوری شدند. از آنجایی‌که رطوبت بالا باعث از بین رفتن برگ‌ها و مراحل نابالغ می‌شد، نمونه‌های برگی داخل سطل‌هایی قرار گرفته و روی آنها با توری پوشیده شد.

شناسایی گونه‌ی حشره بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی. ابتدا شناسایی گونه حشره براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی صورت گرفت، به این صورت که ویژگی‌های مختلفی از حشرات بالغ در مقیاس‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی بررسی شدند. در گلخانه و در مرحله جمع‌آوری حشره، رنگ، اندازه، شکل بال، موقعیت استراحت و الگوی پرواز مورد توجه قرار گرفته و حشرات براساس اندازه بزرگتر، رنگ روشن‌تر، شکل بال‌های جلو، نحوه قرار دادن بال‌ها موقع استراحت (شکل مثلث ایجاد می‌کند) و نحوه پرواز نامنظم (جدول پیوست ۱) از دیگر گونه‌ها تفکیک شدند.

در آزمایشگاه، اسلایدهای میکروسکوپی موقتی از افراد بالغ سفیدبالک گلخانه تهیه شدند. به این صورت که ابتدا حشرات در محلول پتاسیم هیدروکسید (KOH) ۱۰٪ قرار گرفته و به‌طور غیرمستقیم (لوله آزمایشگاهی حاوی حشرات در محلول KOH داخل بشر محتوی آب قرار گرفته و بشر روی حرارت گذاشته شد) به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. پس از آن با آب مقطر سرد شستشو داده شد و برای پنج دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند. پرپاراسیون میکروسکوپی با استفاده از حشرات رنگ‌بری شده و محلول هویر تهیه شد (Martin, 1987؛ European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2004). ابتدا ویژگی‌های مهم میکروسکوپی از جمله چشم‌های مرکب، شاخک و ساق پاهای دوم مورد بررسی قرار گرفتند که چشم‌ها بدون اوماتیدی متصل کننده بودند، شاخک‌ها در بند سوم بدون موی حسی قوی و در حفره‌ی ششم بدون حفره حسی بودند و موهای ساق پای دوم در حاشیه‌ی جانبی به صورت متمرکز بودند (جدول ۱). سپس نمونه‌های تائید شده با استفاده از کلید شناسایی، مورد بررسی قرار گرفتند (Martin, 1987).

پرورش سفیدبالک گلخانه. سفیدبالک‌های گلخانه روی بوته‌های خیار در داخل گلخانه و درون قفس‌های چوبی (۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر) پوشیده شده با توری و در شرایط دمایی ۲۵±۳ درجه‌ی سیلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد و دوره‌ی نوری طبیعی رهاسازی شده و پرورش یافتند.

استخراج DNA از حشرات بالغ سفیدبالک. استخراج DNA از حدود ۲۰ حشره بالغ نر و ماده از نسل اول جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده سفیدبالک گلخانه و جمعیت خمینی‌شهر سفیدبالک پنبه و به‌روش CTAB انجام شد (Gawel & Jarret, 1991؛ Murray & Thompson, 1980). ابتدا بالغین با استفاده از CO_2 بیهوش شده و به لوله آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس مراحل استخراج DNA برای سه تکرار انجام شد. نمونه DNA استخراج شده روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد بارگذاری شد و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه ژل‌داک (Gel Documentation) (Vilber, France) مشاهده شدند.

شناسایی گونه حشره به‌صورت مولکولی. از توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز یک (*COI*) برای تعیین گونه سفیدبالک استفاده شد. برای این منظور، واکنش زنجیره‌ای پلی مرازی (PCR) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر درون تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت (Bio-Rad, USA). واکنش PCR با استفاده از محلول پایه (ساخته شده در آزمایشگاه، جدول پیوست ۲) و آغازگرهای ژن سیتوکروم اکسیداز یک (L2-N-3014, C1-J-2195; Metabion, Germany) (جدول ۱) انجام شد. محلول پایه در آزمایشگاه ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفت. به‌این ترتیب که مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs)، آنزیم Taq DNA polymerase، بافر PCR، آب مقطر استریل و کلرید منیزیم ($Mgcl_2$) مخلوط شدند (جدول پیوست ۲). ابتدا ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به ازای هر واکنش، در تیوب ریخته شد. سپس، مخلوط نوکلئوتیدی (Yekta Tajhiz Azma Co.) به‌مقدار ۰/۵ میکرولیتر و بافر PCR به میزان ۲ میکرولیتر به‌ازای هر واکنش اضافه شدند. یک میکرولیتر کلرید منیزیم نیز با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Co.) مورد استفاده قرار گرفت. در آخرین مرحله‌ی تهیه مخلوط واکنش، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Co.)، به‌سرعت به مخلوط اضافه شد (جدول پیوست ۲) (Mohammed *et al.*, 2020). برای انجام واکنش PCR ابتدا پنج میکرولیتر نمونه DNA درون تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتر قرار داده شد و سپس ۱۵ میکرولیتر از محلول پایه به هر نمونه DNA اضافه شد تا حجم مخلوط واکنش به ۲۰ میکرولیتر برسد.

چرخه‌ی PCR شامل: ۱) واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۲) ۳۰ چرخه شامل سه مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه و گسترش در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و ۳) گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول‌های PCR در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۲ درصد بارگذاری شده و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه ژل‌داک دیده شدند. محصولات مورد نظر به همراه آغازگرها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند.

توالی‌یابی و شناسایی مولکولی همزیست‌ها. به‌منظور ارزیابی حضور همزیست‌های اجباری و اختیاری، آغازگرهای مناسب برای شناسایی همزیست‌های مهم سفیدبالک گلخانه طبق منابع ارایه شده تهیه شدند. PCR با استفاده از پرایمرهایی برای ژن‌های *16S rRNA* در *Portiera* sp.، *Wolbachia* و *Rickettsia* sp.، *Hamiltonella* sp. و *Cardinium* sp. و ژن‌های *23S rRNA* در *Arsenophonus* sp. و *Fritschea* sp. (Metabion, Germany) انجام گرفت (جدول ۱). واکنش PCR در دو حجم نهایی ۱۵ (برای ارزیابی وجود/عدم وجود باند) یا ۲۵ (برای توالی‌یابی ژن‌های هدف) با استفاده از مسترمیکس (Ampliqon) و در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت (Bio-Rad, USA). DNA از جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده مورد استفاده قرار گرفته و همزیست‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند. چرخه‌ی PCR شامل: ۱) واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۲) ۳۰ چرخه شامل سه مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و ۳) گسترش نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول‌های PCR روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد بارگذاری شده و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه ژل‌داک مشاهده شدند.

برای توالی‌یابی همزیست‌ها، از جمعیت‌های خمینی‌شهر سفیدبالک گلخانه و پنبه (شاهد) استفاده شد. در صورت وجود باند اضافه، با استفاده از کیت Favorgen (Yekta Tajhiz Azma Co.) خالص سازی از ژل طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. محصولات مورد نظر به همراه آغازگرها برای تعیین توالی به آزمایشگاه جامع تحقیقات علوم پزشکی اصفهان ارسال شد و خوانش از دو سمت با استفاده از دستگاه توالی‌یابی (Applied Biosystem) انجام شد.

جدول ۱– آغازگرهای PCR مناسب برای شناسایی سفیدبالک گلخانه و همزیست‌های مهم اولیه و ثانویه در سفیدبالک‌های گلخانه و پنبه.

Table 1. PCR primers for the identification of the greenhouse whitefly and the primary and secondary symbionts of cotton and greenhouse whiteflies.

Targeted taxon	Targeted gene	Primers	Size (bp)	Sequences (5' - 3')	References
Trialeurodes vaporariorum	*COI*	C1-J-2195 L2-N-3014	850	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	(Frohlich *et al.*, 1999; Chiel *et al.*, 2007; ; Skaljac *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Gorsane *et al.*, 2011; ; McKenzie *et al.*, 2012; Bing *et al.*, 2013; Marubayashi *et al.*, 2014; Skaljac *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020a; Paredes-Montero *et al.*, 2020)
Portiera	*16S rRNA*	28F 1098R	1000-1100	TGCAAGTCGAGCGGCATCAT AAAGTTCCCGCCTTATGCGT	(Zchori-Fein & Brown, 2002; Gao *et al.*, 2014; Skaljac *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020a)
Arsenophonus	*23S rRNA*	Ars23S.1 Ars23S.2	600	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	(Cass *et al.*, 2014; Kapantaidaki *et al.*, 2015; Skaljac *et al.*, 2017)
Wolbachia	*16S rRNA*	Wol16S-f Wol16S-r	600	CGGGGGAAAAATTTATTGCT AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	(Kapantaidaki *et al.*, 2015; Skaljac *et al.*, 2017)
Hamiltonella	*16S rRNA*	Ham-F Ham-R	1000	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG CCCGGGAACGTATTCACCGTAG	(Gao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020a)
Rickettsia	*16S rRNA*	RB_F RB_R	900	GCTCAGAACGAACGCTATC GAAGGAAAGCATCTCTGC	(Kapantaidaki *et al.*, 2015; ; Skaljac *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020a; Liu *et al.*, 2020b)
Cardinium	*16S rRNA*	CFB_F CFB_R	400	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT	(Kapantaidaki *et al.*, 2015; Skaljac *et al.*, 2017)
Fritschea	*23S rRNA*	U23F 23SIGR	600	GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA TGGCTCATCATGCAAAAGGCA	(Thao *et al.*, 2003; Kapantaidaki *et al.*, 2015)

تجزیه و تحلیل داده‌ها. پس از توالی‌یابی، ابتدا کیفیت کروماتوگرام توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) بررسی شده و سپس معکوس مکمل (Reverse complement) خوانش‌های ریورس با استفاده از همین نرم‌افزار ایجاد شد. دو طرف خوانش مربوط به هر ژن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) همردیف (Blastn>Align two or more sequences) شدند تا یک توالی واحد برای هر ژن ایجاد شود. پس از آن، توالی‌ها با استفاده از الگوریتم BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با توالی‌های موجود در داده‌های بانک ژنوم NCBI مقایسه شدند. توصیف‌ها، مقادیر E. value و درصد شباهت برای هر ژن بدست آمدند.

نتایج

جمع‌آوری سفیدبالک‌ها و شناسایی گونه آنها به‌صورت ریخت‌شناسی. نتایج شناسایی جمعیت‌های مختلف (استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و کلید شناسایی) نشان داد که از میان مزارع متعددی که مورد بازدید قرار گرفتند، فقط در مزرعه باغ‌ابریشم گونه سفیدبالک گلخانه وجود داشت و در سایر مناطق گونه سفیدبالک پنبه مشاهده شدند (جدول ۲). از میان گلخانه‌های متعددی که مورد بازدید قرار گرفتند، در مناطق یفران، باغ‌ملک، زیباشهر، خمینی شهر (گلخانه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان) خولنجان و نسیم‌آباد، سفیدبالک گلخانه مشاهده شدند در حالی که در سایر مناطق گلخانه‌ای مورد بازدید، گونه سفیدبالک پنبه مشاهده شد (جدول ۲).

شناسایی گونه حشره به‌صورت مولکولی. توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز یک (*COI*) سفیدبالک گلخانه دارای الکتروفروگرام با کیفیت قابل قبول بوده و قطعه‌ای به طول ۸۴۷ جفت باز خوانش کرده بود که در منابع نیز طول این قطعه حدود ۸۵۰ جفت باز گزارش شده بود (Skaljac *et al.*, 2017). نتیجه‌ی بلاست نیز حاکی از ۱۰۰٪ شباهت با ژن *COI* گونه *Trialeurodes vaporariorum* (با کد مالکیت KR110200.1) بود.

توالی‌یابی و شناسایی مولکولی همزیست‌ها. وجود و عدم وجود همزیست‌های *Portiera* sp.، *Wolbachia* sp.، *Rickettsia sp.*، *Hamiltonella* sp.، *Cardinium* sp.، *Arsenophonus* sp. و *Fritschea* sp. در جمعیت خمینی‌شهر سفیدبالک پنبه و جمعیت‌های باغ‌ابریشم، یفران، باغ‌ملک، زیباشهر، خمینی شهر و نسیم‌آباد سفیدبالک گلخانه با انجام PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سفیدبالک پنبه خمینی‌شهر دارای همزیست‌های باکتریایی *Portiera* sp.، *Arsenophonus* sp.، *Hamiltonella* sp.، *Rickettsia* sp. و *Fritschea* sp. است (شکل ۱A).

در رابطه با جمعیت‌های مختلف سفیدبالک گلخانه، همزیست‌های *Portiera* sp. و *Arsenophonus* sp. در تمام جمعیت‌های جمع‌آوری شده وجود داشتند. همزیست‌های *Hamiltonella* sp. و *Rickettsia* sp. در تمام جمعیت‌ها به‌غیر از جمعیت‌های خولنجان و باغ‌ابریشم ردیابی شد. همزیست *Fritschea* sp. در جمعیت‌های خمینی‌شهر، نسیم‌آباد، باغ ابریشم، خولنجان و یفران ردیابی شد. همزیست *Cardinium* در جمعیت یفران مشاهده شده و همزیست *Wolbachia* sp. در هیچ‌کدام از جمعیت‌ها ردیابی نشد (شکل ۱B-H). برای اطمینان از اختصاصی بودن تکثیر، طول قطعه باندها روی ژل‌ها (شکل ۱) با منابع مقایسه شدند که نشان از اختصاصی بودن واکنش‌ها بود. نتیجه توالی‌یابی جمعیت‌های خمینی‌شهر سفیدبالک گلخانه و پنبه (شاهد) و BLAST آنها نشان از شباهت با منابع نزدیک داشت. توالی‌های مربوط به باکتری‌های *Portiera* spp. در سفیدبالک گلخانه با ۹۹/۸ درصد به گونه *Candidatus* Portiera aleyrodidarum (با شماره دسترسی MG840322 .1، E- value: ۰.۰) و در سفیدبالک پنبه با ۹۸/۵۳ درصد به گونه *Candidatus* Portiera aleyrodidarum (با شماره دسترسی CP016304.1، E- value: ۰.۰) شباهت داشتند. توالی‌های مربوط به باکتری‌های *Arsenophonus* spp. در سفیدبالک گلخانه با ۹۸/۲۶ درصد به جنس *Arsenophonus* (با شماره دسترسی MN238755.1 E- value: ۰.۰) و در سفیدبالک پنبه با ۹۷/۰۶ درصد به جنس *Arsenophonus* (با شماره دسترسی MN238758.1 E- value: ۰.۰) شباهت داشتند. در مورد باکتری‌های *Hamiltonella* spp.، توالی‌های مربوطه در سفیدبالک گلخانه با ۹۹/۸۹ درصد به گونه *Candidatus* Hamiltonella sp. (با شماره دسترسی MF581646.1، E- value: ۰.۰) و در سفیدبالک پنبه با ۹۸/۳۱ درصد به جنس *Hamiltonella* (با شماره دسترسی MF581628.1، E- value: ۰.۰) شباهت داشتند. توالی‌های مربوط به باکتری‌های *Rickettsia* spp. در سفیدبالک گلخانه با ۹۹/۳۶ درصد به جنس *Rickettsia* (با شماره دسترسی GU563834.1، E- value: e-156) و در سفیدبالک پنبه با ۹۹/۱۰ درصد به جنس *Rickettsia* (با شماره دسترسی MN902241.1، E- value: ۰.۰) شباهت داشتند.

بحث

تاکنون طیفی وسیع از همزیست‌های اجباری و اختیاری از گونه‌های مختلف سفیدبالک‌ها گزارش شده است. همزیست‌های اجباری *Portiera* spp. تاریخچه‌ی تکامل طولانی با همه گونه‌های زیرخانواده‌ی Aleyrodinae دارند (Thao & Baumann, 2004). این همزیست‌های اولیه باعث غنای جیره غذایی میزبان با مواد غذایی ضروری همچون آمینواسیدها و کارتنوئیدها می‌شوند (Santos-Garcia *et al.*, 2012). علاوه بر همزیست‌های اجباری، سفیدبالک‌ها طیفی از همزیست‌های ثانویه یا اختیاری شامل گونه‌های *Hamiltonella* sp.، *Cardinium* sp.، *Fritschea* sp.، *Wolbachia* sp.، *Arsenophonus* sp.، *Hemipteriphilus* sp. و *Rickettsia* sp. را دارا می‌باشند (Bing *et al.*, 2013؛ Nirgianaki *et al.*, 2003؛ Zchori-Fein & Brown, 2002). تنوع همزیستی در سفیدبالک پنبه بسیار بالا بوده به‌طوری‌که همزیستی با *Hamiltonella*، *Arsenophonus*، *Cardinium*، *Wolbachia*، *Fritschea*، *Rickettsia* و *Hemipteriphilus* از این آفت گزارش شده است (Wang *et al.*, 2019) که می‌تواند به‌دلیل اهمیت بالای این آفت و تحقیقات فراوان بر آن باشد. در پژوهش حاضر نیز، سفیدبالک پنبه (جمعیت خمینی‌شهر) دارای همزیست اجباری *Portiera* sp. و همزیست‌های اختیاری *Arsenophonus* sp.، *Hamiltonella* sp.، *Rickettsia* sp. و *Fritschea* sp. بود.

جدول ۲- مکان، گیاه میزبان، نوع کشت، گونه سفیدبالک و زمان نمونه‌برداری.

Table 2. Location, host plant, cultivation type, whitefly species, and sampling time.

Sampling location	Insect Species	Host plant	Cultivation type	Sampling time
Chadegan	*B. tabaci*	Bell pepper	Greenhouse	Oct. 2022
Ghale Sorkh	*B. tabaci*	Bell pepper Cucumber	Greenhouse	Oct. 2023
Dehaghan	*B. tabaci*	Bell pepper	Greenhouse	May 2023
Gorgab	*B. tabaci*	Tomato	Field	May 2022
Falavarjan	*B. tabaci*	Bell pepper	Greenhouse	Jul. 2023
Sin	*B. tabaci*	Cucumber	Greenhouse	Oct. 2022
Mobarake	*B. tabaci*	Bell pepper Eggplant	Greenhouse	Apr. 2022
Khomeinishahr	*B. tabaci* *T. vaporariorum*	Tobacco	Greenhouse	May 2022
Kholenjan	*T. vaporariorum*	Cucumber	Greenhouse	Apr. 2023
Yafran	*T. vaporariorum*	Tomato	Greenhouse	Apr. 2022
Baghmalek	*T. vaporariorum*	Tomato	Greenhouse	Aug. 2022
Zibashahr	*T. vaporariorum*	Cucumber	Greenhouse	Jul. 2022
Nasim Abad	*T. vaporariorum*	Tomato	Greenhouse	June 2022
Bagh Abrisham	*T. vaporariorum*	Cucumber	Field	May 2022

از نظر کارایی، نقش و مکانیسم عمل همزیست‌ها، مطالعات نشان داده‌اند که همزیست‌های اختیاری در سفیدبالک پنبه باعث القای مقاومت در حشره نسبت به پارازیتوئیدها (Mahadav *et al.*, 2008)، افزایش تحمل آفت به دماهای بالا (Brumin *et al.*, 2011) ، تغییر در ظرفیت انتقال ویروس‌های گیاهی به ویژه TYLCV (Gottlieb *et al.*, 2010) تغییر در دامنه‌ی میزبانی (Liu *et al.*, 2020a) و تغییر حساسیت میزبان به آفت‌کش‌ها می‌شوند (Barman *et al.*, 2021؛ Dângelo *et al.*, 2021؛ Wang *et al.*, 2023؛ Ghanim & Kontsedalov, 2009؛ Kontsedalov *et al.*, 2008). از طرف دیگر، آلودگی به برخی همزیست‌ها (باتوجه به گونه همزیست) می‌تواند باعث افزایش (*Rickettsia* در گروه ژنتیکی MEAM1 از *B. tabaci*) یا کاهش (*Arsenophonus*) شایستگی میزبان شده و یا اثر چندانی بر عوامل زیستی میزبان نداشته باشد (Lei *et al.*, 2021؛ Raina *et al.*, 2015؛ Himler *et al.*, 2011). بنابراین، همزیست‌ها از جوانب مختلف روی زیست‌شناسی و حساسیت آفت اثرگذار هستند که این قضیه، می‌تواند مدیریت آفت را در جهت کنترل موثرتر آن تحت تاثیر قرار دهد.

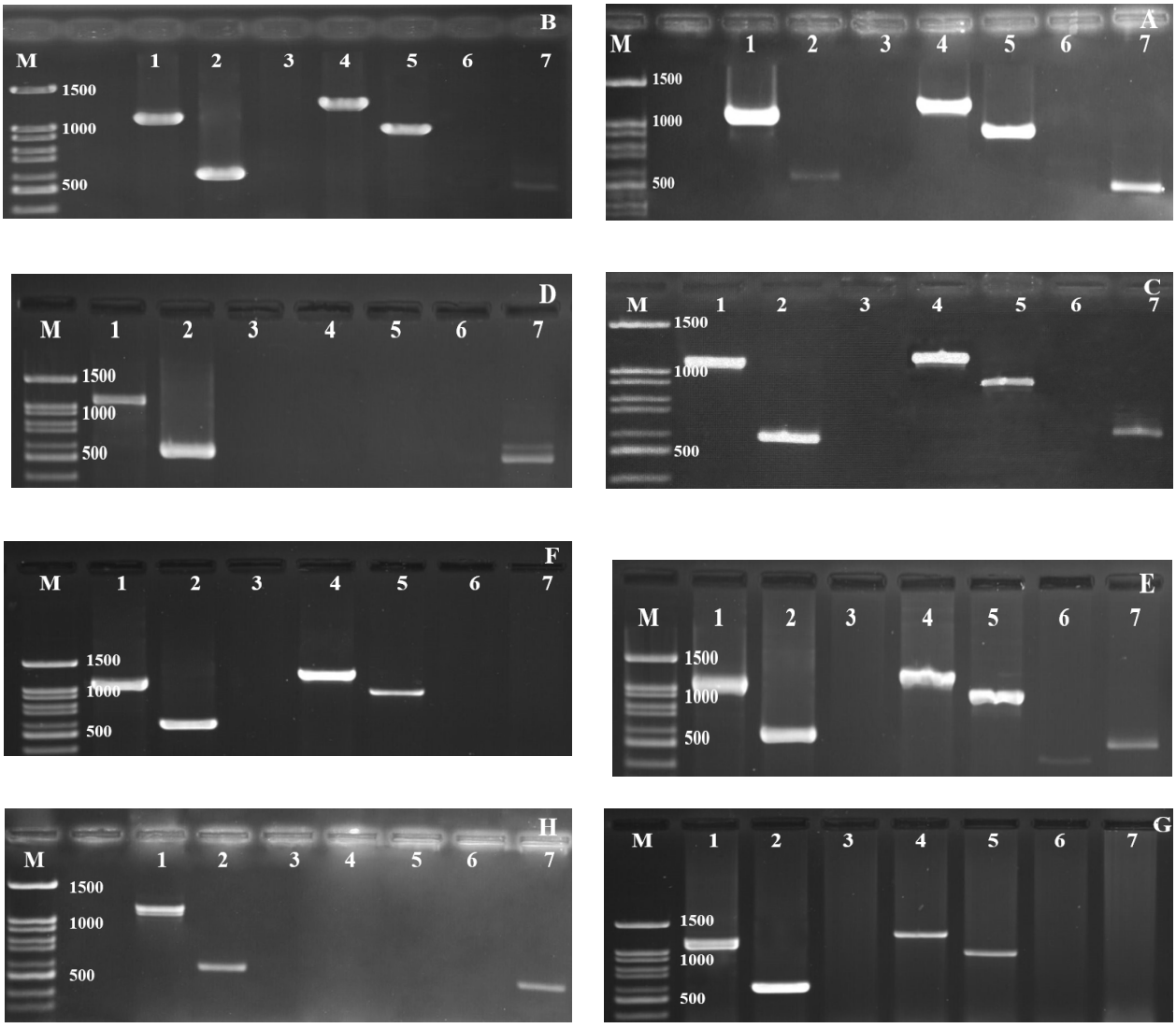
در رابطه با سفیدبالک گلخانه، بیشتر مطالعات برای شناسایی نوع همزیست بوده و در مقایسه با دیگر سفیدبالک‌ها صورت گرفته است. در پژوهشی نمونه‌های مختلف آفت، از سراسر نقاط جهان جمع‌آوری شده و وجود همزیست‌های اولیه و ثانویه بررسی شدند که نشان دهنده‌ی وجود باکتری‌های همزیست *Arsenophonus* (در تمام افراد نر و ماده)، *Wolbachia* (نسبت اندک) و *Cardinium* (فقط در تعدادی نمونه مربوط به جمعیت یونان) در سفیدبالک گلخانه بود (Kapantaidaki *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری تنوع همزیستی در سه گونه سفیدبالک *B. tabaci*، *T. vaporariorum* و Haliday *Siphoninus phillyreae* در جنوب شرقی اروپا بررسی شد که آلودگی به همزیست‌های *Arsenophonus* و *Hamiltonella* (در بیشتر جمعیت‌ها) و *Wolbachia*، *Rickettsia*، *Cardinium* (در یکی از جمعیت‌ها) در سفیدبالک گلخانه ثابت شد (Skaljac *et al.*, 2017). آلودگی به *Portiera*، *Serratia*، *Arsenophonus* *Wolbachia* و *Pseudomonas* نیز در جمعیت سفیدبالک گلخانه در آمریکا گزارش شد و بیان شد که اگرچه سفیدبالک گلخانه و پنبه با یکدیگر در ارتباط بودند، همزیستی با جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها وجود دارد و بنابراین انتقال افقی همزیست با سفیدبالک پنبه وجود ندارد (Cass *et al.*, 2014).

در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی سفیدبالک پنبه از عراق و سفیدبالک گلخانه از انگلیس بررسی شده و رابطه‌ی همزیستی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شد که بیانگر وجود همزیست اجباری *P. aleyrodidarum* در نرها و ماده‌های سفیدبالک گلخانه بود درحالی‌که همزیست اختیاری *Arsenophonus* sp. در بیش‌تر افراد ماده این آفت (و نه نرها) یافت شد (Kareem, 2018). در این پژوهش، تمام جمعیت‌های جمع‌آوری شده سفیدبالک گلخانه دارای همزیست اجباری *Portiera* sp. و اختیاری *Arsenophonus* sp. بودند. در مورد سایر همزیست‌های اختیاری، *Hamiltonella* sp. و *Rickettsia* sp. در تمام جمعیت‌ها به‌غیر از جمعیت‌های خولنجان و باغ‌ابریشم، همزیست اختیاری *Cardinium* در جمعیت یفران و همزیست اختیاری *Fritschea* sp. در جمعیت‌های خمینی‌شهر، نسیم‌آباد، باغ ابریشم، خولنجان و یفران ردیابی شدند.

در مورد نقش همزیست‌ها در سفیدبالک گلخانه، اخیراً مطالعه‌ای در مورد همزیست اختیاری *Arsenophonus* انجام گرفته که نشان دهنده‌ی اثر این باکتری در تغییر نسبت جنسی آفت بود و پیشنهاد شد که این عمل در اثر تنظیم باروری و تامین ویتامین‌های گروه B توسط همزیست باشد (Wang *et al.*, 2020). روشن کردن مکانیسم‌های نهفته در اثر این همزیستی‌های درون سلولی بر زیست‌شناسی تولید مثلی حشرات می‌تواند راه‌های جدیدی را برای کنترل آفات فراهم کند.

در این پژوهش، شناسایی همزیست‌های اجباری و اختیاری جمعیت‌های مختلف سفیدبالک گلخانه در استان اصفهان مورد توجه و بررسی قرار گرفت. در همین راستا، ارزیابی تنوع همزیستی جمعیت‌های سفیدبالک گلخانه در سایر نقاط کشور پیشنهاد می‌شود. از طرف دیگر، باتوجه به اهمیت و نقش فراوان همزیست‌ها در بسیاری ویژگی‌های زیست‌شناسی و مدیریتی سفیدبالک‌ها و از آن جمله سفیدبالک گلخانه، بررسی نحوه اثر

همزیست‌های اختیاری برای سفیدبالک گلخانه در ادامه این پژوهش پیشنهاد می‌شود. امید است نتایج این پژوهش مبنایی برای مطالعات تکمیلی در زمینه‌ی همزیستی و شناخت نقش همزیست‌ها باشد.



شکل ۱- شناسایی همزیست‌های سفیدبالک پنبه در جمعیت خمینی‌شهر (شاهد) (A) و همزیست‌های سفیدبالک گلخانه در جمعیت‌های خمینی شهر (B)، نسیم‌آباد (C)، باغ‌ابریشم (D)، یفران (E)، باغ‌ملک (F)، زیباشهر (G) و خولنجان (H).

M: DNA marker; lane 1: *Portiera*; lane 2: *Arsenophonus*; lane 3: *Wolbachia*; lane 4: *Hamiltonella*; lane 5: *Rickettsia*; lane 6: *Cardinium* and lane 7: *Fritschea*.

Fig. 1. Identification of the symbionts of cotton whitefly in Khomeini Shahr population (A) and the symbionts of greenhouse whitefly for Khomeini Shahr (A), Kholenjan (B), Nasimabad (C), Bagh Abrisham (D), Yafran (E), Baghmalek (F), and Zibashahr (G) populations. M: DNA marker; lane 1: *Portiera*; lane 2: *Arsenophonus*; lane 3: *Wolbachia*; lane 4: *Hamiltonella*; lane 5: *Rickettsia*; lane 6: *Cardinium* and lane 7: *Fritschea*.

سپاسگزاری

نویسندگان تشکر صمیمانه از استاد گرامی، جناب آقای دکتر محمد مهرآبادی به‌خاطر همکاری در این طرح را دارند.

حمایت مادی و معنوی

نویسندگان کمال سپاس را از بنیاد ملی علم ایران (INSF) به خاطر حمایت مالی این پژوهش در قالب طرح پسادکتری (شماره ۴۰۰۴۱۷۴) را دارند.

REFERENCES

Ayoubi, A., Talebi, A. A., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2020) Coinfection of the secondary symbionts, *Hamiltonella defensa* and *Arsenophonus* sp. contribute to the performance of the major aphid pest, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Science*, *27*(1), 86-98. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12603.

Barman, M., Samanta, S., Thakur, H., Chakraborty, S., Samanta, A., Ghosh, A. & Tarafdar, J. (2021) Effect of neonicotinoids on bacterial symbionts and insecticide-resistant gene in whitefly, *Bemisia tabaci*. Insects, 12(8). https://doi.org/10.3390/insects12080742.

Bi, J. L., Toscano, N. C. & Ballmer, G. R. (2002) Seasonal population dynamics of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on strawberries in Southern California. *Journal of Economic Entomology*, *95*(6), 1179–1184. https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.6.1179.

Bing, X. L., Yang, J., Fein, E. Z., Wang, X. W. & Liu, S. S. (2013) Characterization of a newly discovered symbiont of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(2), 569–575. https://doi.org/10.1128/AEM.03030-12.

Brumin, M., Kontsedalov, S. & Ghanim, M. (2011) *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science*, *18*(1), 57–66. https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2010.01396.x.

Cass, B. N., Mozes-Daube, N., Iasur-Kruh, L., Bondy, E. C., Kelly, S. E., Hunter, M. S. & Zchori-Fein, E. (2014) Bacterial endosymbionts in field-collected samples of *Trialeurodes* sp. nr. *abutiloneus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Research in Microbiology*, *165*(2), 77–81. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.01.005.

Chiel, E., Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Inbar, M. & Ghanim, M. (2007) Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research*, *97*(4), 407–413. 10.1017/S0007485307005159.

Choi, W. Il, Lee, E. H., Choi, B. R., Park, H. M. & Ahn, Y. J. (2003) Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, *96*(5), 1479–1484. 10.1603/0022-0493-96.5.1479.

Dale, C. & Moran, N. A. (2006) Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, *126*(3), 453–465. 10.1016/j.cell.2006.07.014.

Dângelo, R. A. C., Michereff-Filho, M., Inoue-Nagata, A. K., da Silva, P. S., Chediak, M. & Guedes, R. N. C. (2021) Area-wide insecticide resistance and endosymbiont incidence in the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1 (B biotype): A Neotropical context. *Ecotoxicology*, *30*(6), 1056–1070. https://doi.org/10.1007/s10646-021-02432-3.

Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M. E. & Boulétreau, M. (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(11), 6247–6252. https://doi.org/10.1073/pnas.1013042.

Engel, P. & Moran, N. A. (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 699–735. 10.1111/1574-6976.12025.

Erdogan, C., Velioglu, A. S., Gurkan, M. O., Denholm, I. & Moores., G. D. (2021) Detection of resistance to pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Protection*, *146*, 105661. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105661.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2004) Diagnostic protocols for regulated pests-*Bemisia tabaci*. *EPPO Bulletin*, *34*(2), 281–288.

Ferrari, J. & Vavre, F. (2011) Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1569), 1389–1400. 10.1098/rstb.2010.0226.

Frago, E., Dicke, M. & Godfray, H. C. J. (2012) Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, *27*(12), 705–711. http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2012.08.013.

Frohlich, D. R., Torres-Jerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Brown, J. K. (1999) A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, *8*(10), 1683–1691. 10.1046/j.1365-294x.1999.00754.x.

Fukatsu, T. & Hosokawa, T. (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(1), 389–396. 10.1128/AEM.68.1.389-396.2002.

Gao, R. R., Zhang, W. P., Wu, H. T., Zhang, R. M., Zhou, H. X., Pan, H. P., Zhang, Y. J., Brown, J. K. & Chu D. (2014) Population Structure of the Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), an Invasive Species from the Americas, 60 Years after Invading China. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(8), 13388–13400. 10.3390/ijms150813514.

Gawel, N. J. & Jarret, R. L. (1991) A Modified CTAB DNA Extraction Procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 262–266.

Ghanim, M. & Kontsedalov, S. (2009) Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with

bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*, 65(9), 939–942. 10.1002/ps.1795.

Gorsane, F., Ben Halima, A., Ben Khalifa, M., Bel-Kadhi, M. S. & Fakhfakh, H. (2011) Molecular characterization of *Bemisia tabaci* populations in tunisia: Genetic structure and evidence for multiple acquisition of secondary symbionts. *Environmental Entomology*, 40(4), 809–817. 10.1603/EN10162.

Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljac, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek H., Vavre, F., Fleury F. & Ghanim M. (2010) The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species . *Journal of Virology*, 84(18), 9310–9317. 10.1128/JVI.00423-10.

Haine, E. R. (2008) Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1633), 353–361. 0.1098/rspb.2007.1211.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windowsprogram for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98.

Hill, B. G. (1969) A morphological comparison between two species of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) and *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) which occur on tobacco in the Transvaal. *Phytophylactica*, 1(34), 127–146.

Himler, A. G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J. E., Kozuch, A., Kelly, S. E., Tabashnik, B. E., Chiel, E., Duckworth, V. E., Dennehy, T. J., Zchori-Fein, E. & Hunter, M. S. (2011) Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science*, 332(6026), 254–256. https://doi.org/10.1126/science.1199410.

Kapantaidaki, D. E., Ovčarenko, I., Fytrou, N., Knott, K. E., Bourtzis, K., Tsagkarakou, A. & Markow, T. (2015) Low levels of mitochondrial DNA and symbiont diversity in the worldwide agricultural pest, the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Heredity*, 106(1), 80–92. 10.1093/jhered/esu061.

Karamipour, N., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2021) Removal of gut symbiotic bacteria negatively affects life history traits of the shield bug, *Graphosoma lineatum*. *Ecology and Evolution*, 11(6), 2515-2523. https://doi.org/10.1002/ece3.7188.

Karamipour, N., Mehrabadi, M. & Fathipour, Y. (2016) Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma Lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, *6*(September). http://dx.doi.org/10.1038/srep33168.

Kareem, A. A. (2018) *Population genetic structure and symbionts of whitefly Trialeurodes vaporariorum and Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae), in the UK and Iraq*. Newcastle University.

Kashkouli, M., Castelli, M., Floriano, A. M., Bandi, C., Epis, S., Fathipour, Y., Mehrabadi, M. & Sassera, D. (2021a) Characterization of a novel *Pantoea* symbiont allows inference of a pattern of convergent genome reduction in bacteria associated with Pentatomidae. *Environmental Microbiology*, 23(1), 36–50. 10.1111/1462-2920.15169.

Kashkouli, M., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2020) Habitat visualization, acquisition features and necessity of the gammaproteobacterial symbiont of pistachio stink Bug, *Acrosternum heegeri* (Hem.: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*, 110(1), 22–33. 10.1017/S0007485319000245.

Kashkouli, M., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2019a) Heritable Gammaproteobacterial symbiont improves the fitness of *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, *48*(5), 1079–1087. 10.1093/ee/nvz089.

Kashkouli, M., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2019b) Potential management tactics for pistachio stink bugs, *Brachynema germari, Acrosternum heegeri* and *Acrosternum arabicum* (Hemiptera: Pentatomidae): high temperature and chemical surface sterilants leading to symbiont suppression. *Journal of Economic Entomology* 112(1), 244–254. 0.1093/jee/toy324.

Kashkouli, M., Fathipour, Y. & Mehrabadi, M. (2021b) The crucial role of the endosymbiont *Pantoea* sp. in morphology and mating of the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Agricultural Science and Technology* 23(1), 137–148.

Kashkouli, M., Mehrabadi, M. & Fathipour, Y. (2021c) The symbionts. In Omkar (Ed.), *Microbial Approaches for Insect Pest Management* (pp. 217–269).

Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M. & Ghanim, M. (2008) The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest management Science* 64(11), 789–792. 10.1002/ps.1595.

Lei, T., Zhao, J., Wang, H. L., Liu, Y. Q. & Liu, S. S. (2021) Impact of a novel *Rickettsia* symbiont on the life history and virus transmission capacity of its host whitefly (*Bemisia tabaci*). *Insect Science* 28(2), 377–391. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12797.

Liu, Y. H., Shah, M. M. R., Song, Y. & Liu, T.-X. (2020a) Host plant affects symbiont abundance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insects* 11(8), 501. 10.3390/insects11080501.

Liu, Y., Fan, Z. Y., An, X., Shi, P. Q., Ahmed, M. Z. & Qiu, B. L. (2020b) A single-pair method to screen *Rickettsia*-infected and uninfected whitefly *Bemisia tabaci* populations. *Journal of Microbiological Methods* 168, 105797. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105797.

Mahadav, A., Gerling, D., Gottlieb, Y., Czosnek, H. & Ghanim, M. (2008) Parasitization by the wasp *Eretmocerus mundus* induces transcription of genes related to immune response and symbiotic bacteria proliferation in the whitefly

Bemisia tabaci. *BMC Genomics* 9, 1–11. 10.1186/1471-2164-9-342.

Manzano, M. R. & van Lenteren, J. C. (2009) Life history parameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) at different environmental conditions on two bean cultivars. *Neotropical Entomology* 38(4), 452–458. 10.1590/s1519-566x2009000400002.

Martin, J. H. (1987) An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera Aleyrodidae). *Tropical Pest Management 33*(4), 298–322.

Marubayashi, J. M., Kliot, A., Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., Pavan, M. A. & Ghanim, M. (2014) Diversity and localization of bacterial endosymbionts from whitefly species collected in Brazil. *PLoS ONE*, 9(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108363.

McKenzie, C. L., Hodges, G., Osborne, L. S., Byrne, F. J. & Shatters Jr, R. G. 2012). Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotypes in North America after the Q Invasion. *Journal of Economic Entomology* 105(3), 753–766. 10.1603/ec11337.

Mohammed, M. A., Karaca, M. M., Döker, İ. & Karut, K. (2020) Monitoring insecticide resistance and endosymbiont composition in greenhouse populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) from Mersin, Turkey. *Phytoparasitica* 48(4), 659–672. 10.1007/s12600-020-00812-9.

Moran, N. A., McCutcheon, J. P. & Nakabachi, A. (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics* 42, 165–190. 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119.

Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19), 4321–4326. 10.1093/nar/8.19.4321.

Nirgianaki, A., Banks, G. K., Frohlich, D. R., Veneti, Z., Braig, H. R., Miller, T. A., Bedford, I. D., Markham, P. G., Savakis, Ch. & Kostas B. (2003) *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology* 47(2), 93–101. 10.1007/s00284-002-3969-1.

Paredes-Montero, J. R., Zia-Ur-Rehman, M., Hameed, U., Haider, M. S., Herrmann, H. W. & Brown, J. K. (2020) Genetic variability, community structure, and horizontal transfer of endosymbionts among three Asia II-*Bemisia tabaci* mitotypes in Pakistan. *Ecology and Evolution* 10(6), 2928–2943. https://doi.org/10.1002/ece3.6107.

Patel, C., Srivastava, R. M. & Samraj, J. M. (2022) Comparative study of morphology and developmental biology of two agriculturally important whitefly species *Bemisia tabaci* (Asia II 5) and *Trialeurodes vaporariorum* from North-Western Himalayan region of India. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 65. 10.1590/1678-4324-2022210034.

Prado, S. S., Hung, K. Y., Daugherty, M. P. & Almeida, R. P. P. (2010) Indirect effects of temperature on stink bug fitness, via maintenance of gut-associated symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4), 1261–1266. 10.1128/AEM.02034-09.

Raina, H. S., Rawal, V., Singh, S., Daimei, G., Shakarad, M. & Rajagopal, R. (2015) Elimination of *Arsenophonus* and decrease in the bacterial symbionts diversity by antibiotic treatment leads to increase in fitness of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Infection, Genetics and Evolution* 32(March), 224–230. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.022.

Santos-Garcia, D., Farnier, P. A., Beitia, F., Zchori-Fein, E., Vavre, F., Mouton, L., Moya, A., Amparo, L. & Francisco J. S. (2012) Complete genome sequence of "*Candidatus* portiera aleyrodidarum" BT-QVLC, an Obligate symbiont that supplies amino acids and carotenoids to *Bemisia tabaci*. *Journal of Bacteriology*, 194(23), 6654–6655. 10.1128/JB.01793-12.

Siddiqui, J. A., Khan, M. M., Bamisile, B. S., Hafeez, M., Qasim, M., Rasheed, M. T., Rasheed, M. A., Ahmad, S., Shahid, M. I. & Xu, Y. (2022) Role of insect gut microbiota in pesticide degradation: A Review. *Frontiers in Microbiology* 13(May). https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870462.

Skaljac, M., Kanakala, S., Zanic, K., Puizina, J., Pleic, I. L. & Ghanim, M. (2017) Diversity and phylogenetic analyses of bacterial symbionts in three whitefly species from Southeast Europe. *Insects* 8(4), 113. https://doi.org/10.3390/insects8040113.

Skaljac, M., Zanic, K., Ban, S. G., Kontsedalov, S. & Ghanim, M. (2010) Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiology 10*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-142.

Su, Q., Zhou, X. & Zhang, Y. (2013) Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative and Integrative Biology* 6(3), e23804. 10.4161/cib.23804.

Sudakaran, S., Kost, C. & Kaltenpoth, M. (2017) Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology* 25(5), 375–390. http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014.

Thao, M. L. L., Baumann, L., Hess, J. M., Falk, B. W., Ng, J. C. K., Gullan, P. J. & Baumann, P. (2003) Phylogenetic evidence for two new insect-associated chlamydia of the family *Simkaniaceae*. *Current Microbiology* 47(1), 46–50. 10.1007/s00284-002-3953-9.

Trienens, M. & Beukeboom, L. W. (2019) Symbionts in insect biology and pest control – an introduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167(3), 153–155. 10.1111/eea.12771.

Wang, H. L., Lei, T., Xia, W. Q., Cameron, S. L., Liu, Y. Q., Zhang, Z. & Wang, X. W.(2019) Insight into the microbial world of *Bemisia tabaci* cryptic species complex and its relationships with its host. *Scientific Reports* 9(1), 1–15. 10.1038/s41598-019-42793-8.

Wang, Q., Luo, C. & Wang, R. (2023) Insecticide resistance and its management in two invasive cryptic species of *Bemisia tabaci* in China. *International Journal of Molecular Sciences* 24(7). https://doi.org/10.3390/ijms24076048.

Wang, Y. Bin, Ren, F. R., Yao, Y. L., Sun, X., Walling, L. L., Li, N. N . & Luan, J. B. (2020) Intracellular symbionts drive sex ratio in the whitefly by facilitating fertilization and provisioning of B vitamins. *ISME Journal* 14(12), 2923–2935. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0717-0.

Wang, Z., Yan, H., Yang, Y. & Wu, Y. (2010) Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. *Pest Management Science* 66(12), 1360–1366. 10.1002/ps.2023.

Watanabe, L. F. M., Bello, V. H., De Marchi, B. R., Sartori, M. M. P., Pavan, M. A. & Krause-Sakate, R. (2018) Performance of *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* on Tomato chlorosis virus (ToCV) infected plants. *Journal of Applied Entomology* 142(10), 1008–1015. https://doi.org/10.1111/jen.12559.

Zchori-Fein, E. & Brown, J. K. (2002) Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95(6), 711–718. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0711:DOPAWB]2.0.CO;2.

Obligate and facultative symbionts in different populations of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae)

Marzieh Kashkouli[1, 2] & Jahangir Khajehali[1]

1-Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
2-Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

✉ mkashkouli@iut.ac.ir https://orcid.org/0000-0001-5011-6261
✉ khajeali@iut.ac.ir https://orcid.org/0000-0002-3042-028X

Article History
Received: 16 November 2023 | *Accepted:* 23 January 2024 | Subject Editor: Reyhaneh Darsouei

Abstract
The greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), is one of the harmful pests of vegetables and ornamental plants. The high damage caused by this pest has made it necessary to design an integrated pest management (IPM) programs based on biology and its symbiotic relationships. Since the symbionts of greenhouse whiteflies are less known so far in Iran, their diversity in different pest populations has been investigated in the upcoming research. For this purpose, sampling was done from contaminated greenhouses and fields of Isfahan province. Then, DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were performed to assess the presence/absence of symbionts, sequencing of target genes, and molecular identification of the whitefly species. Also, the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius), was used as a control in different stages. The target species was identified as *T. vaporariorum* based on the morphology and cytochrome oxidase one (*COI*) gene sequence. Examining the diversity of symbionts showed the presence of *Portiera* sp. and *Arsenophonus* sp. in all collected populations. *Hamiltonella* sp. and *Rickettsia* sp. were detected in all populations except Kholenjan and Bagh Abrisham. *Cardinium* sp. has been observed in the population of Yafran and *Fritschea* sp. was detected in the populations of Khomeini Shahr, Nasim Abad, Kholenjan, Bagh Abrisham, and Yafran, while *Wolbachia* was not detected in any of the populations. Considering the lack of information about the symbiotic diversity of the greenhouse whitefly and also the lack of studies in Iran, this research can be a basis for further studies in the field of symbiosis and to recognize the role of symbionts.

Keywords: Bacterial symbionts, Cytochrome Oxidase I (*COI*), *Portiera*, *Arsenophonus*

Corresponding Author: Marzieh Kashkouli (Email: mkashkouli@iut.ac.ir)

Citation: Kashkouli, M. & Khajehali, J. (2024) Obligate and facultative symbionts in different populations of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae). *J. Entomol. Soc. Iran* 44 (1), 1-10. https://doi.org.10.61186/jesi.44.1.1