

بررسی قدرت بیمارگری و ویژگی‌های مولکولی چند جدایه‌ی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت‌الماسی*

مریم کلانتری^۱، رسول مرزبان^۱، زهرا معقولی‌فرد^۲، حبیب عباسی‌پور^۲

۱- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران- تهران

۲- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شاهد - تهران

مسئول مکاتبات: مریم کلانتری، m_kalantary2000@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۱

۱۷-۲۶ (۲)

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۲۶

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌خاطر مزیت‌های فراوان مانند اثر اختصاصی روی لارو حشرات آفت، عدم تأثیر نامطلوب روی محیط زیست و جانداران غیر هدف و همچنین سهولت ترکیب و تلفیق با سایر روش‌های کنترل، جایگاه ویژه‌ای در مدیریت کنترل آفات دارد. اولین قدم به‌عنوان پایه و اساس تحقیق روی این باکتری، بررسی قدرت بیمارگری جدایه‌ها و سویه‌های بیمارگر در کنترل آفات مورد هدف است. در این تحقیق قدرت بیمارگری سه جدایه‌ی بومی و یک نمونه‌ی تجاری (Dipel®) روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* و شب‌پره‌ی پشت‌الماسی، *Plutella xylostella* در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) بررسی شد. غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC50) سه جدایه‌ی بومی KD2، 20، 6R و نمونه‌ی تجاری دیپیل روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه به‌ترتیب $1/21 \times 10^7$ ، $1/8 \times 10^7$ ، $1/39 \times 10^7$ و $6/91 \times 10^7$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد که بیمارگری جدایه‌ی KD2، با کمترین غلظت کشنده ۵۰ درصد روی کرم قوزه‌ی پنبه بیشتر بود. غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد جدایه‌های بومی فوق روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت‌الماسی به‌ترتیب $6/1 \times 10^4$ ، $3/4 \times 10^3$ ، $2/9 \times 10^5$ و $8/8 \times 10^4$ اسپور در میلی‌لیتر بود که بیشترین قدرت بیمارگری باکتری Bt مربوط به جدایه‌ی 20 بود. در بررسی مولکولی جدایه‌ها مشخص شد که جدایه‌های مورد بررسی دارای ژن‌های *cry* یکسانی نیستند.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، کرم قوزه‌ی پنبه، شب‌پره‌ی پشت‌الماسی، قدرت بیمارگری، ویژگی مولکولی

مقدمه

در کشت بوم‌های گیاهان خانواده‌ی چلیپانیان یافت می‌شود و از بیشترین پراکنش جهانی در بین بال‌پولک‌داران برخوردار است (Talekar & Shelton, 1993). در دنیا برای کنترل آن در جهان سالانه بیش از یک میلیارد دلار هزینه می‌شود (Verkerk & Wright, 1996; Dezianian et al., 2010). این شب‌پره در سال ۱۳۱۷ توسط افشار به‌عنوان یکی از آفات مهم کلم از ایران گزارش شد (Behdad, 1982) و در سال ۱۳۷۸ در مزارع کلم استان تهران طغیان کرد (Marzban & Baniameri, 2004). این آفت با دارا بودن تنوع میزبانی بالا، قدرت پراکنش و تولیدمثل زیاد و

کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae) آفت مهم پنبه، گوجه‌فرنگی، ذرت، نخود، توتون، لوبیا، سویا و کنجد است (Fit, 1989). حشره‌ی یاد شده پلی‌فاژ بوده و در دنیا بیش از ۷۰ گونه میزبان برای آن گزارش شده است. لاروهای این آفت از برگ‌های جوان، قوزه‌ها، بلال، میوه و غلاف بذور گیاهان میزبان خود تغذیه می‌کند (Mitter et al., 1993). شب‌پره‌ی پشت‌الماسی یا بیید کلم،

* این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم‌ها مریم کلانتری و زهرا معقولی‌فرد می‌باشد.

جدیدی که با شرایط اقلیمی هر منطقه سازگاری بیشتری دارد، دست‌یافت که برای آفات کلیدی و مهم نظیر کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت الماسی مؤثر باشند، که در این راستا ده‌ها جدایه‌ی مختلف از این باکتری از خاک‌های زراعی کشور جدا شده است (Marzban & Salehi, 2006). اغلب ژن‌های تولیدکننده‌ی دلتا‌اندوتوکسین در *B. thuringiensis* توسط DNA خارج کروموزومی که بر روی پلاسمید در اندازه و تعداد مختلف قرار دارند، کد می‌شوند (Levinson *et al.*, 1990). تاکنون تعداد زیادی ژن پلاسمیدی در ارتباط با *B. thuringiensis* شناخته شده است، که در بین ۲۱ زیرگونه‌ی بررسی شده تعداد پلاسمید از ۲ تا ۱۲ عدد در هر زیرگونه متغیر بوده است. وجود ژن کریستال پروتئینی روی پلاسمید به وسیله‌ی کلون کردن ژن و هیبریداسیون به اثبات رسیده است. ژن‌های مسئول کریستال پروتئینی می‌توانند در یک زیرگونه به شکل پلاسمیدی و کروموزومی وجود داشته باشند. اگرچه این ژن‌های کروموزومی مانند هم نبوده و ممکن است تنظیم آن‌ها متفاوت باشد. در برخی موارد ژن کروموزومی به صورت نهفته است که فقط در حضور ژن پلاسمیدی بیان می‌شود، تاکنون بیش از ۴۰۰ ژن مختلف در زیر گونه‌های مختلف این باکتری شناسایی شده است (Tanada & Kaya, 1993).

بررسی بیماری‌گری جدایه‌های Bt روی حشرات مختلف و تعیین دامنه‌ی میزبانی، انجام آزمایشات فراوانی را ایجاد می‌کند. حاصل این آزمایشات مبین قدرت عمل و خصوصیات بیولوژیک عامل بیمارگر خواهد بود. لذا لزوم برقراری روش‌های استاندارد ساده و شناخته شده برای انجام ارزیابی‌ها امری ضروری خواهد بود که تحت عنوان آزمایشات زیست‌سنجی یا Bioassay مطرح می‌شود. آزمایش‌های زیست‌سنجی جهت تشخیص تفاوت‌های بیولوژیکی بین جدایه‌های باکتری Bt و ارزیابی کیفیت و توان بیماری‌گری جدایه‌های این باکتری در میزبان صورت خواهد گرفت. وقتی حشره با باکتری Bt آلوده شود ممکن است واکنش‌های متفاوتی نظیر مرگ حشره، تأخیر در رشد، کاهش وزن شفیره و نیز بدشکل شدن حشره رخ دهد. اگر هدف از کاربرد Bt از بین بردن آفت باشد، بنابراین در

خصوصیات ژنتیکی، به‌خیلی از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده است (Shelton, 2004; Wright, 2004; Grzywacz *et al.*, 2009) استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات گیاهی از گذشته‌های دور روشی معمول بوده است. اما هزینه‌های اقتصادی بالا، ظهور نژادهای مقاوم به آفت‌کش‌های شیمیایی، نگرانی‌های زیست‌محیطی و آلودگی در چرخه‌ی غذایی سبب کاهش کاربرد روش‌های شیمیایی در کنترل آفات گیاهی شده است. دلایل فوق دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به‌عنوان یک چالش جدی فرآوری محققان قرار داده است. استفاده از حشره‌کش‌های میکروبی در یکی دو دهه‌ی اخیر مورد توجه جدی قرار گرفته است. عوامل میکروبی بسیار متنوع هستند، ده‌ها باکتری می‌توانند در حشرات ایجاد بیماری نمایند. ولی فقط تعداد اندکی از نظر تجاری دارای اهمیت هستند که مهمترین آن‌ها *Bacillus thuringiensis* Ber. است. واریته یا زیرگونه‌ی *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* روی شب‌پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه بسیار مؤثر است. این باکتری به‌خاطر اثر اختصاصی روی آفات، عدم تأثیر نامطلوب روی محیط زیست و جانداران غیرهدف جایگاه ویژه‌ای را در مدیریت تلفیقی آفات دارد (Kurstak & Tijssen, 1982). باکتری *B. thuringiensis*، یک باکتری گرم مثبت، اسپوردار و متحرک با تاژک جانبی است. هم‌زمان با تشکیل اسپور داخل اسپورانژیوم، پروتئین‌های کریستالی حاوی دلتا‌اندوتوکسین تولید می‌کند که برای برخی حشرات سمی می‌باشد. دلتا‌اندوتوکسین با اتصال به گیرنده‌های موجود روی سلول‌های اپیتلیال روده‌ی میانی حشره باعث تخریب سلولی و مرگ آن می‌شود. باکتری Bt هیچ اثر سوئی روی زنبورهای پارازیتوئید شب‌پره‌ی پشت الماسی ندارد (Brunner & Stevens, 1986)، ولی برای شب‌پره‌ی پشت الماسی که به بسیاری از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده، بسیار سمی است (Sun *et al.*, 1986). از آنجایی که Bt میکروارگانسیم عمومی خاک بوده و در همه‌جا یافت می‌شود (Travis & O'Callaghan, 1989). لذا با مطالعات وسیع در جهت شناسایی جدایه‌های مختلف این باکتری در مناطق اکولوژیکی کشور می‌توان به سویه‌های

۲- بررسی نوع ژن *cry* در جدایه های Bt

نوع سموم پروتئینی Bt در سه جدایه ی بومی KD2، 20، 6R و نمونه ی تجاری دیپل از طریق ردیابی ژن های *cry* در آن ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای استخراج DNA، در ابتدا از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت NB، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و سلول های باکتری به کمک سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ g در یک دقیقه ته نشین شدند. سلول های ته نشین شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم، ۱۰ میلی مولار تریس و ۰/۱ درصد توئین ۲۰) سوسپانسیون شده و به طور مجدد سانتریفوژ شدند. سپس ویال ها به حمام آبی با دمای ۹۹ درجه ی سلسیوس منتقل شده و در نهایت رونشین حاوی DNA به ویال سترون دیگر منتقل و در دمای ۲۰- درجه ی سلسیوس نگهداری شد. ردیابی زیر گروه های ژن های *cry* با چهار جفت پرایمر عمومی شامل جفت پرایمرهای *cry1*، *cry2*، *cry3* و *cry4* صورت گرفت، که به طور خلاصه مشخصات پرایمرهای ژن های *cry* در این مطالعه در جدول یک آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات عمومی و خصوصی پرایمرهای ژن های

cry در راسته ی پروانه ها (Ben et al., 1997).

Table 1- Characteristics of general and specific primers for lepidopteran active cry-type genes (Ben et al., 1997).

Primers	Sequences	Product size (bp)
cry1(d)	5-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3	277
cry1(r)	5-TTGTGACACTTCTGCTCCATT-3	
cry2(d)	5-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3	498
cry2(r)	5-CGGATAAAAATAATCTGGGAAATAGT-3	
cry3(d)	5-CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC-3	1367-1392
cry3(r)	5-CATCTGTGTTTCTGGAGGCAAT-3	
cry4(d)	5-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3	3762-3738
cry4(r)	5-GCGTGACATACCCATTCCAGTCC-3	

۳- آماده سازی باکتری

جدایه های 20، 6R و KD-2 باکتری *B. thuringiensis* از بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور فراهم شد (جدول ۲). جدایه ها در محیط کشت LB، 1% tryptone

زیست سنجی، مرگ و میر به عنوان معیار قرار می گیرد. از نظر آماری دقیق ترین اندازه گیری پاسخ مرگ و میر جمعیت حشره تعیین غلظتی از Bt است که ۵۰ درصد جمعیت حشره را می کشد، به عبارتی تعیین LC₅₀ آن می باشد. در این تحقیق بیمارگری چند جدایه Bt که از بین ده ها جدایه ی بومی غربال شده اند (Marzban, 2001; Marzban & Salehi, 2006) روی دو حشره ی آفت مهم محصولات کشاورزی بررسی و جدایه یا جدایه های برتر معرفی شدند. همچنین شناسایی مولکولی جدایه های مزبور با استفاده از PCR و الکتروفورز انجام شد، که از مزایای این روش سرعت کار و حساسیت بالا می باشد.

مواد و روش ها

۱- پرورش حشرات

در این بررسی پروانه ی کرم قوزه ی پنبه از مزارع گوجه فرنگی گرگان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. لاروهای این حشره به علت هم خواری، به صورت انفرادی درون لوله های آزمایش (۱×۶ cm) روی غذای مصنوعی پرورش داده شدند (Teakle & Jensen, 1991). پس از دوران لاروی و شفیرگی پروانه ها ظاهر و در دسته های ۳۰ تایی (♂۱۵ + ♀۱۵) در ظروف استوانه ای پلاستیکی به قطر و ارتفاع، ۱۷ و ۲۵ سانتی متر قرار گرفتند سطح درونی دیواره ظروف به وسیله ی کاغذ جاذب رطوبت پوشانده شده و در کف استوانه، پتری حاوی آب و عسل ۱۰ درصد قرار داده شد. پرورش تمام مراحل رشدی آفت در اتاق پرورش با دمای ۲۷ درجه ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره ی روشنایی به تاریکی ۱۶:۸ ساعت انجام شد. کلنی اولیه ی شب پره ی پشت الماسی، *P. xylostella* از مزارع کلم اسلام شهر و کهریزک (جنوب تهران) جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. برای تشکیل کلنی از قفس پرورش به شکل مکعب مستطیل از جنس پلکسی گلاس به ابعاد ۴۰×۴۰×۶۰ سانتی متر در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره ی نوری: تاریکی، ۱۶:۸ ساعت استفاده شد. تغذیه ی لاروها با استفاده از برگ های کلم و پروانه ها از محلول آب عسل ۱۰ درصد انجام شد.

شروع و به تیمارهای با غلظت بالاتر برای کاهش خطا انجام شد. برای هر غلظت، ۴۵ لوله آزمایش در سه تکرار ۱۵ تایی تدارک دیده شد، در هر لوله آزمایش یک لارو چهار روزه که هم‌زمان تفریخ شده بودند و از نظر رنگ و اندازه یکسان بودند (Evans & Shapiro, 1981) توسط قلم‌مو روی غذای تیمار شده داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شدند (Hughes *et al.*, 1984) پس از ۴۸ ساعت که لاروها از غذای آلوده به باکتری تغذیه کردند، به لوله‌های آزمایش مشابه دارای غذای سالم و عاری از Bt انتقال یافتند (Kumar *et al.*, 2008). میزان مرگ و میر لاروها تا هفت روز از شروع آزمایش ثبت گردید. معیار مرگ و میر لاروها، سیاه شدن و عدم واکنش لارو به ضربه‌ی سوزن بود.

۴-۲- زیست‌سنجی جدایه‌ها با استفاده از غذای

طبیعی روی شب‌پره‌ی پشت الماسی

برای هر غلظت سه ظرف پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ده سانتی‌متر و ارتفاع سه سانتی‌متر در نظر گرفته که برای تهویه مناسب درب ظروف سوراخ و با پارچه‌ی توری پوشانده شد. برای هر غلظت سه تکرار و در هر تکرار از دو دیسک برگ‌گی تازه کلم با قطر سه سانتی‌متر، استفاده شد. دیسک‌های برگ‌گی قبل از آغشته شدن به باکتری، به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار داده و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. روی هر سمت دیسک برگ‌گی ۱۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر ریخته و با لوپ استریل پخش تا تمام سطح برگ‌گی به باکتری آغشته گردید. برای شاهد از محلول آب و Tween 80 ۰/۰۴ درصد استفاده شد. سپس برگ‌ها را در محیطی استریل قرار داده تا سطح آن‌ها خشک شود. در هر ظرف به‌وسیله‌ی پنس استریل دو دیسک برگ‌گی تیمار شده قرار داده و در قسمت قاعده‌ای برگ‌گی برای حفظ رطوبت برگ‌گی، پنبه‌ی مرطوب قرار داده شد. درون هر ظرف به‌وسیله‌ی قلم‌موی استریل تعداد ۱۵ عدد لارو سن دوم قرار داده و سپس روی درب هر ظرف، اطلاعات مربوط به غلظت، شماره‌ی تکرار و تاریخ درج شد. در هر دو روزه‌ی زیست‌سنجی ظروف در ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره‌ی روشنائی به

extract 0.5%, NaCl 1%, pH 7-7.2) در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴ روز با دور rpm ۱۹۰ شیک شدند. وجود اسپور-کریستال آزاد در نمونه‌ها با مشاهده‌ی میکروسکوپی تأیید شد، سپس داخل یخچال در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Marzban *et al.*, 2009) اسپور و کریستال‌ها را داخل آب مقطر و Tween80 (به میزان ۰/۰۴ درصد) به صورت سوسپانسیون یک‌نواختی در آورده و غلظت‌های حداقل و حداکثر با زیست‌سنجی اولیه روی حشرات مذکور محاسبه، سپس با روش شمارش کلنی با رقیق کردن غلظت حداکثر، غلظت‌های دیگر با فواصل لگاریتمی به دست آمد. بدین ترتیب برای هر جدایه هفت غلظت مختلف حاصل شد.

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های Bt.

Table 2- Profile of Bt isolates.

Isolates	Host	Area of collection
20	soil of field	Mashhad
KD-2	soil of field	Kohgiluyeh-va-Boyer Ahmad
6R	soil of jungle	Rasht
Dipel	-	commercial product

۴-۳- روش‌های زیست‌سنجی

۴-۱- زیست‌سنجی جدایه‌ها با استفاده از غذای

مصنوعی روی کرم قوزه‌ی پنبه

ابتدا یک زیست‌سنجی مقدماتی روی لارو ۴ روزه برای به دست آوردن حداقل و حداکثر مرگ و میر انجام شد. سپس هفت غلظت برای آزمون زیست‌سنجی به‌منظور محاسبه LC₅₀ بر اساس روش مرزبان (2001) تعیین شد. در این روش سه جدایه‌ی بومی و یک جدایه تجاری (Diple®)، با استفاده از غذای مصنوعی روی لارو سن دو (چهار روزه) کرم قوزه‌ی پنبه آزمایش و میزان بیماری‌گری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تکه‌های غذای مصنوعی به وزن یک گرم بریده شد و روی سطوح هر تکه غذا با استفاده از سمپلر مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده ریخته، سپس داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شدند. لازم به ذکر است که آغشته کردن سطوح غذا از تیمار شاهد

بین رفتند برای جدایه‌های KD2، 6R، و 20[®] Dipel روی کرم قوزله‌ی پنبه به ترتیب $1/21 \times 10^7$ ، $1/31 \times 10^7$ ، و $8/8 \times 10^7$ اسپور در میلی‌لیتر $6/91 \times 10^7$ برآورد شد. جدایه‌ی KD2 در مقایسه با جدایه‌های دیگر پایین‌ترین LC₅₀ را دارد، که می‌تواند به‌عنوان جدایه‌ی برتر استفاده شود. بین دو جدایه‌ی بومی KD2 و 6R از نظر مرگ و میر روی کرم قوزله‌ی پنبه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. مقادیر غلظت‌کننده ۵۰ درصد برای جدایه‌ها روی لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت‌الماسی، *P. xylostella*، به ترتیب $6/1 \times 10^4$ ، $2/9 \times 10^6$ ، و $3/4 \times 10^3$ اسپور در میلی‌لیتر $8/8 \times 10^4$ محاسبه گردید و با توجه به اینکه مقادیر حد بالا و پایین LC₅₀ جدایه‌های بومی 20، KD-2 و 6R با هم، هم‌پوشانی نداشتند، بنابراین از لحاظ سمیت با هم اختلاف داشتند. مقدار غلظت‌کننده ۵۰ درصد (LC₅₀) جدایه 20 باکتری *B. thuringiensis* نسبت به جدایه‌های KD-2، Dipel و 6R روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت‌الماسی کمتر بود (جدول ۲). لذا با توجه به نتایج، جدایه 20 به‌عنوان مؤثرترین جدایه روی شب‌پره‌ی پشت‌الماسی معرفی شد.

در زیست‌سنجی جدایه‌ها روی کرم قوزله‌ی پنبه دو جدایه‌ی بومی KD2 و 6R از نظر کشندگی با هم هم‌پوشانی دارند که نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار از نظر سمیت روی لارو سن دو کرم قوزله‌ی پنبه است ولی این دو جدایه بومی با نمونه‌ی تجاری و جدایه 20 هم‌پوشانی نداشت در صورتی که نمونه Dipel با جدایه 20 هم‌پوشانی داشت و سمیت نمونه‌ی تجاری و جدایه 20 از دو جدایه‌ی بومی دیگر کمتر بود (شکل ۱- B). با توجه به شکل یک در شب‌پره‌ی پشت‌الماسی حد بالا و پایین جدایه 20 با بقیه جدایه‌ها هم‌پوشانی ندارد. همچنین مقدار غلظت‌کننده ۵۰ درصد (LC₅₀) جدایه KD-2 نسبت به Dipel و 6R کمتر است (جدول ۱) و این جدایه با جدایه Dipel هم‌پوشانی دارد که این نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار از نظر سمیت روی لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت‌الماسی، *P. xylostella* است. ولی این جدایه با جدایه‌ی 20 و 6R هم‌پوشانی نداشته و سمیت آن از جدایه 6R بیشتر و از جدایه‌ی 20 کمتر است (شکل ۱- A). علاوه بر این جدایه‌ی

تاریکی ۱۶:۸ ساعت قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت که لاروها از غذای آلوده به باکتری تغذیه کردند، به ظروف آزمایش مشابه دارای غذای سالم و عاری از Bt انتقال یافتند. میزان مرگ و میر لاروها تا هفت روز از شروع آزمایش ثبت شد. معیار مرگ و میر لاروها، سیاه شدن و عدم واکنش لارو به ضربه‌ی سوزن بود. در آزمایش زیست‌سنجی اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله‌ی نرم‌افزار رایانه‌ای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقدار LC₅₀ تعیین و شاخص‌های آماری مربوطه مشخص شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های زیست‌سنجی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله‌ی نرم‌افزار رایانه‌ای SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و غلظت‌کننده ۵۰ درصد (LC₅₀) جدایه‌های مختلف باکتری محاسبه و مؤثرترین جدایه‌ی باکتری مشخص شد. برای مقایسه‌ی LC₅₀ جدایه‌های مختلف با هم از دو روش Overlapping و Ratio استفاده شد.

نتایج

نتایج وجود ژن cry در جدایه‌های Bt

نتایج محصول ناشی از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های cry نشان داد که جدایه‌های 6R و KD حاوی ژن‌های *cry1*، *cry2* و *cry3* می‌باشد. جدایه 20 حاوی دو ژن *cry1* و *cry3* بود، حضور هر چهار ژن *cry* مورد بررسی در جدایه Dipel به اثبات رسید و به‌عبارتی ژن *cry4* فقط در جدایه Dipel ردیابی شد.

مقایسه‌ی شدت بیماری‌گری جدایه‌های Bt روی

کرم قوزله‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت‌الماسی

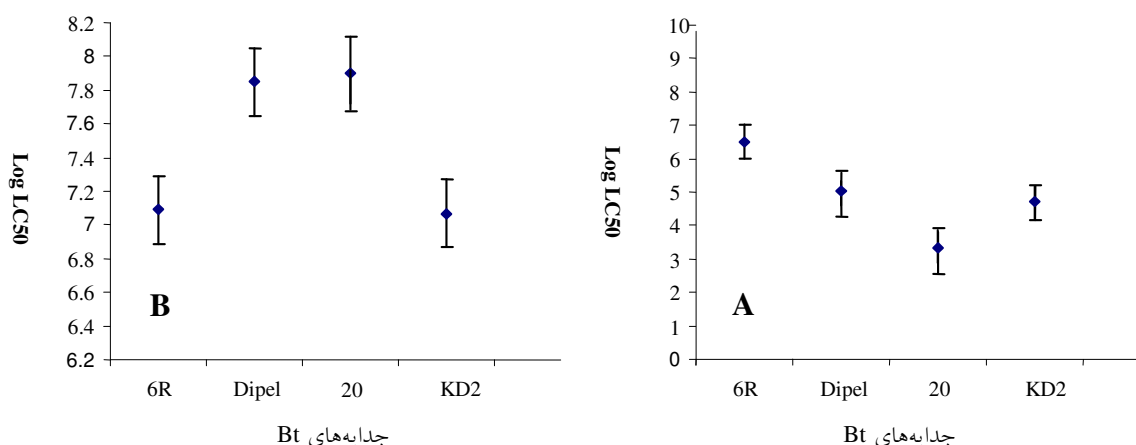
نتایج نشان داد که هر چهار جدایه باکتری برای کنترل لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت‌الماسی و کرم قوزله‌ی پنبه مناسب هستند. نتایج به‌دست آمده به کمک برنامه‌ی کامپیوتری SAS و Probit تجزیه و معادله خط پروبیت و LC₅₀ هر جدایه به‌دست آمد. پس از تعیین میزان LC₅₀ برای هر یک از جدایه‌های باکتری، جدایه‌ها با هم مقایسه شدند. میزان غلظتی که در آن ۵۰ درصد جمعیت لاروی (LC₅₀) از

6R نسبت به جدایه‌های 20، KD-2 و Dipel بالاترین غلظت کشته ۵۰ درصد (LC_{50}) را دارد (جدول ۳) و این جدایه با بقیه جدایه‌ها هم‌پوشانی نداشته که نشان‌دهنده‌ی این است که کمترین سمیت را دارد.

جدول ۳- زیست‌سنجی جدایه‌های باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه.

Table 3- Bioassay bacteria isolates on the second larvae of Cotton Bollworm and Diamondback moth.

Pest	Isolate	LC_{50} Spore ml ⁻¹	Confidence Interval (%95)		Slope	Intercept	χ^2	df	Pr>chisq
			Low. limit	Up. limit					
Diamond back moth	20	3.4×10^3	7.2×10^2	13×10^2	0.31	-1.11	0.63	5	0.9863
	Dipel	8.8×10^4	1.9×10^4	42×10^4	0.31	-1.51	0.19	5	0.9992
	KD-2	6.1×10^4	2.6×10^4	14×10^4	0.57	-2.71	0.77	5	0.9785
	6R	2.9×10^6	1.5×10^6	5.2×10^6	0.79	-5.10	0.43	5	0.9944
Cotton Bollworm	20	8.8×10^7	5.5×10^7	14×10^7	0.77	-6.16	2.53	5	0.9892
	Dipel	6.9×10^7	4.5×10^7	11×10^7	0.96	-2.56	1.43	5	0.9792
	KD-2	1.21×10^7	7.6×10^6	18×10^6	1.18	-3.37	2.84	5	0.9985
	6R	1.31×10^7	8.7×10^6	18×10^6	1.22	-3.73	1.28	5	0.9763



شکل ۱- دامنه‌ی تغییرات لگاریتم LC_{50} جدایه‌های مورد بررسی باکتری *B. thuringiensis* روی لارو سن دوم، A. شب‌پره‌ی پشت الماسی و B. کرم قوزه‌ی پنبه.

Fig. 1- Confidence intervals overlap of isolates LC_{50} on second larvae A. Diamondback moth and B. Cotton Bollworm .

در مقایسه‌ی Ratio، LC_{50} جدایه‌های مورد آزمایش روی کرم قوزه را بر کوچک‌ترین LC_{50} جدایه‌ی باکتری تقسیم و میزان سمیت جدایه‌ها مقایسه شد. LC_{50} جدایه‌های 20، 6R و Dipel بر LC_{50} جدایه‌ی KD2 (کوچک‌ترین LC_{50}) تقسیم شد که جدایه‌ی KD2 $1/0.8$ ، $7/2$ و $5/7$ بار سمی تر است. در شب‌پره‌ی پشت الماسی، $P. xylostella$ نسبت به جدایه‌ی 20 در مقایسه با سه جدایه‌ی دیگر است.

در مقایسه‌ی LC_{50} جدایه‌های مورد آزمایش روی کرم قوزه را بر کوچک‌ترین LC_{50} جدایه‌ی باکتری تقسیم و میزان سمیت جدایه‌ها مقایسه شد. LC_{50} جدایه‌های 20، 6R و Dipel بر LC_{50} جدایه‌ی KD2 (کوچک‌ترین LC_{50}) تقسیم شد که جدایه‌ی KD2 $1/0.8$ ، $7/2$ و $5/7$ بار سمی تر است. در شب‌پره‌ی پشت الماسی LC_{50} جدایه‌های

بحث

H-4، H-5 و H-6 باکتری *B. thuringiensis* را روی شب پرهی پشت الماسی، *P. xylostella* آزمایش کرده و همه سروتایپها را روی *P. xylostella* مؤثر اعلام کردند. در همین راستا (Ooi, 1981) تأثیر فرآورده های تجاری Dipel و Bactospeine را روی لاروهای سه روزهی شب پرهی پشت الماسی، *P. xylostella* بررسی و جدایه Dipel را برای کنترل این آفت مؤثرتر اعلام کرد. هر جدایه یا سروتایپ Bt می تواند چند نوع توکسین (Cry) تولید کند که Cry1 عموماً روی پروانه ها مؤثر است اما توکسین های دیگری نیز مانند Cry2 روی شب پره ها مؤثراند. پروانه ها در میان گروه توکسین های Cry1 نیز حساسیت یکسانی ندارند، به عبارتی Cry1C یا Cry1D روی شب پرهی پشت الماسی مؤثر اما روی کرم قوزهی پنبه بی تأثیر است، و یا Cry1Aa روی شب پرهی پشت الماسی نسبت به کرم قوزهی پنبه مؤثرتر است، اما هر دو گونه این حشره نسبت به Cry1Ab و Cry1Ac حساس هستند (Ben *et al.*, 1997; Eldridge, 2011) براین اساس دلیل تأثیر متفاوت جدایه های Bt روی گونه های پروانه ها به خاطر تنوع توکسین سروتایپ های Bt است و نشان دهندهی تأثیر اختصاصی جدایه های این باکتری روی حشرات است. در بررسی مولکولی جدایه ها مشخص شد که جدایه ها دارای ژن های cry یکسانی نیستند و نه تنها در سطح Cry1 بلکه در سطح Cry با هم تفاوت دارند. در انتخاب جدایه های تجاری علاوه بر فاکتور پایداری ژنتیکی و توانایی تولید آگروتوکسین بایستی به دامنه ی تأثیر آن جدایه توجه داشت، چرا که ممکن است برخی از پروانه های مضر را کنترل و برخی را مانند گونه های *Spodoptera spp.* به خوبی کنترل نکند.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می دانند از آقای دکتر محسن فرزانه و خانم مهندس آرزو یوسفی به خاطر همکاری های ارزنده ای که در انجام این تحقیق به عمل آوردند کمال تشکر و سپاس خود را اعلام نمایند.

در این تحقیق اثرات قدرت بیمارگری سه جدایه ی بومی باکتری Bt با فرآورده تجاری Dipel روی کرم قوزهی پنبه مقایسه شد. بر اساس نتایج حاصله تأثیر دو جدایه ی بومی Bt روی کرم قوزهی پنبه و شب پرهی پشت الماسی نسبت به فرآورده تجاری Dipel مرگ و میر بیشتری ایجاد کرد. جدایه های بومی باکتری *B. thuringiensis* را روی لارو سن سوم شب پرهی هندی، *Plodia interpunctella* (Hubner) نسبت به جدایه ی تجاری Dipel مؤثرتر اعلام کرد (Marzban, 2001). نتایج به دست آمده از آزمایش ما نیز نشان داد که تأثیر جدایه های بومی (KD-2 و 20) نسبت به جدایه ی تجاری بیشتر است. همچنین دیلمی در سال ۲۰۱۰ مقادیر غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀) برای جدایه ی 20 باکتری *B. thuringiensis* را روی لارو سن دوم شب پرهی پشت الماسی، برابر با اسپور در میلی لیتر ۱۰^۳×۳ اعلام کرد و نشان داد که قدرت بیمارگری این جدایه در مقایسه با جدایه تجاری Dipel بیشتر است (Izadyar, 2002). زیست سنجی چند جدایه ی بومی Bt به همراه فرآورده ی تجاری دیپل روی کرم قوزهی پنبه را آزمایش و مشاهده کرد که جدایه ی 6R فاقد آگروتوکسین است. در تحقیقات انجام شده باکتری *B. thuringiensis* یکی از مؤثرترین حشره کش ها علیه شب پرهی پشت الماسی، *P. xylostella*، سفیده کوچک کلم، *Pieris rapae* L.، کرم و جب کن کلم، *Trichoplusia ni* Hübner. در آمریکا معرفی شد (Eckenrode *et al.*, 1981). همچنین اثر Thuricide را با چندین حشره کش شیمیایی روی *P. xylostella* بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که Thuricide مؤثرتر از حشره کش های شیمیایی است (Ho and Ng, 1970). همچنین جدایه ی تجاری Bitrol (سروتایپ H-1) در غلظت ۱۰^۵×۱۳ اسپور در سانتی متر مربع لاروهای شب پرهی پشت الماسی، *P. xylostella* را در مدت دو روز از بین می برد (Rautapaa, 1967). علاوه بر این (Burgerjon & Biache, 1967) سروتایپ های H-3، H-1،

References

- Behdad, A. 1982.** Pests of Field Crops in Iran. Neshat publication, Isfahan. (In Persian).
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R. & Manasherob, R. 1997.** Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 63: 4883–4890.
- Brunner, E. & Stevens, P.F.E. 1986.** The control of diamondback moth with Thuricide, pp. 213-217. In: Talekar, N. S. & Griggs, T. D. (eds.), Diamondback Moth Management. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan.
- Burgerjon, A. & Biache, G. 1967.** Contribution a L'etude du spectre d'activite de different souches de *Bacillus thuringiensis*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 10: 211-230. (In French with English summary).
- Deilami, A. 2010.** Bioassay studies of some *Bacillus thuringiensis* Iranian strains on larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* L. M.s. Thesis, University of Shahed, 110 pp. (In Persian).
- Dezianian, A., Sajap, A.S., Lau, W.H., Omar, D., Kadir, H.A., Mohzmed, R. & Yusoh, M.R.M. 2010.** Morphological Characteristics of *P. xylostella* Granulovirus and Effects on Its Larval Host Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). American Journal of Agricultural and Biological Science. 5(1): 43-49.
- Eckenrode, C.J., Andaloro, J.T. & Shelton, A.M. 1981.** Suppression of Lepidopterous larvae (*Pieris rapae*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*) in commercial sauerkraut cabbage field and research plots (parathion, *Bacillus thuringiensis*). Economic Entomology. 72: 276-279.
- Eldridge, R. 2011.** Calidad de los Productos Formulados en base a *Bacillus thuringiensis*. http://www.anasac.cl/agropecuarios/opensite_det_20110621205036n.aspx.
- Evans, H.F. & Shapiro, M. 1981.** Viruses, pp. 17–54. In: Lacey, L. (eds.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London.
- Fitt, G. P. 1989.** The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology. 34: 17-52.
- Grzywacz, D., Rossbach, A., Rauf, A., Russell, D.A., Srinivasan, R. & Shelton, A.M. 2009.** Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassica in Asia and Africa. Crop Protection. 29(1): 68-79.
- Ho, T.H. & Ng, K.Y. 1970.** *Bacillus thuringiensis* Berliner for the control of diamondback moth in West Malaysia. Malaysian Agriculture Journal. 47: 313-322.
- Hughes, P.R., Gettig, R.R. & McCarthy, W.J. 1984.** Comparison of the time- Mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. Invertebrate Pathology. 41: 256-261.
- Izadyar, S. 2002.** Bioassay of Iranian strains of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* and determination of β -exotoxin. M.s. Thesis, Reseach and Sciense of Azad University. 117 pp. (In Persian).
- Kumar, N.S., Murugan, K. & Zhang, W. 2008.** Additive interaction of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus and Azadirachtin. BioControl. 53: 869-880.
- Kurstak, E. & Tijssen, P. 1982.** Mode of action, safety and future popects, pp. 3-45. In: Kurstak, E. (eds.), Microbial and Viral Pesticides. Marcel Dekki, Newyork.

- Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C. & Gonzalez, J.M. 1990.** Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxins, and new exotoxins in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology*. 172: 3172-3179.
- Marzban, R. & Baniameri, V. 2004.** An investigation on the effectiveness of some chemical and biological insecticides on Diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae). *Journal of New Agricultural Science*. 1: 14-20.
- Marzban, R. 2001.** Comparative bioassay of some native isolates of *Bacillus thuringiensis* and serotype of *kurstaki* on Indian meal moth (*Plodia interpunctella* Hb.). *Applied Entomology and Phytopathology*. 70: 29-36.
- Marzban, R. & Salehi, J.G. 2006.** Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soils of Iran, pp. 95-100. In: Zaikov, G.E. (eds.), *Biotechnology, Agriculture and the Food Industry*. Nova Science Publishers, New York.
- Marzban, R., He, Q., Liu, X.X. & Zhang, Q.W. 2009.** Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and Cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on Cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 71-76.
- Mitter, C., Robert, W.P. & Matthews, M. 1993.** Biosystematic of the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Annual Review of Entomology*. 38: 207-225.
- Ooi, P.A.C. 1981.** Microbial control of diamondback moth in Cameron Highlands, Malaysia. *Malays Applied Biology*. 10: 49-56.
- Rautapaa, J. 1967.** Notes on the toxicity of a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on some Lepidoptera and Tenthredinidae larvae. *Annals of Agriculture Fennica*. 6: 103-105.
- Shelton, A.M. 2004.** Management of diamondback moth, pp. 47-53. In: Sivapragasam, A., Loke, W.H., Hussan, A.K. & Lim, G.S. (eds.), *The Management of Diamondback Moth and other Crucifer Pests*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Sun, C.N., Wu, T.K., Chen, J.S. & Lee, W.T. 1986.** Insecticide resistance in diamondback moth, Management, PP. 359-371. *Diamondback Moth*. In: Talker, N.S. & Griggs, T.D. (eds.), *Asian Vegetable Research and Development Center*, Taiwan.
- Talekar, N.S. & Shelton, A.M. 1993.** Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*. 38: 275-301.
- Tanada, Y. & Kaya, H. K. 1993.** *Insect Pathology*. Academic Press, Sandiego.
- Teakle, R.E. & Jensen, J.M. 1991.** *Heliothis armigera*, pp. 313-332. In: Singh, p. & Moore, R.F. (eds.), *Hand Book of Insect Rearing*. Elsevier, Amsterdam.
- Travis, R.G., & O'Callaghan, M. 1989.** *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. Wiley, New York.
- Verkerk, R.H.J. & Wright, D.J. 1996.** Multitropic interactions and management of the diamondback moth, a review. *Bulletin of Entomological Research*. 86: 205-216.
- Wright, D. 2004.** Biological control of *Plutella xylostella*: a global perspective, pp. 9-14. In: Bordat, D. & Kirk, A.A. (eds.), *Improving Biocontrol of Plutella xylostella*. Montpellier, France.

Study of virulence and molecular characteristics of some *Bacillus thuringiensis* isolates on cotton bollworm and diamondback moth

Maryam Kalantari¹, Rasoul Marzban¹, Zahra Magollifard², Habib Abbasipour²

1- Department of Biological Control, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture Science, Shahed University, Tehran, Iran.

Corresponding author: M. Kalantari, Email: m_kalantary2000@yahoo.com

Received: June. 06, 2013

1 (2) 17-26

Accepted: Dec. 22, 2013

Abstract

Bacillus thuringiensis bacteria because of many advantages such as specific effect on pest insects larvae, no adverse effects on the environment and non-target organisms and also easy combination with other methods of pest control, has an important role in pest management programs. The first step as a basis for doing research on this bacteria is to study virulence of different isolates and strains of the pathogen in the control of the target pest. In this research, the virulence of three native isolates and a commercial product (Dipel[®]) was evaluated on the larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and diamondback moth, *Plutella xylostella* at 27°C, a relative humidity of 65% and 16L:8D photoperiod. Based on the calculated results, 50% lethal concentration (LC₅₀) of three native isolates of KD2, 20, 6R and commercial product of Dipel on the 2nd larval instars of *H. armigera* were obtained as 1.21×10⁷, 8.8×10⁷, 1.39×10⁷ and 6.91×10⁷ spore ml⁻¹, respectively and KD2 isolate was the best strain among others. Results of 50% lethal concentration (LC₅₀) bioassay of three native isolates and commercial sample of Dipel on the 2nd larval instars of *P. xylostella* were calculated as 6.1×10⁴, 3.4×10³, 2.9×10⁵ and 8.8×10⁴ spore ml⁻¹, respectively and isolate of 20 was the best strain among others. The molecular analysis of the isolates revealed that isolates *cry* genes are not identical.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, virulence, molecular characteristic.
