# ردیابی مولکولی انواع ژن‌های *Cry* در جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های مزارع توتون استان‌های مازندران و گلستان

# Molecular detection of *Cry* genes in the *Bacillus thuringiensis* native isolates from the soils of tobacco fields of Mazandaran and Golestan provinces

**مرضیه شازده احمدی***

دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۲۸

**چکیده**

در سال‌های اخیر، استفاده مداوم از سموم شیمیایی، موجب بروز مقاومت در آفات و آلودگی‌های زیست‌محیطی شده است. از این‌رو، نیاز به کاربرد حشره‌کش‌های سازگار با محیط و ایمن، ضرورت یافته است. یکی از موفق‌ترین عوامل میکروبی در این زمینه، باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) است. باکتری Bt گرم‌مثبت، هوازی، خاکزی و اسپورزا است و پس از اسپورزایی، پروتئین‌های کریستال تشکیل می‌دهد که توسط ژن‌های *Cry* رمزگذاری می‌شوند. بدین منظور در این تحقیق، تعداد ۹۰ جدایه بومی باکتری Bt از خاک‌های مزارع توتون استان‌های مازندران و گلستان، جداسازی و بررسی مولکولی جدایه‌ها بر اساس ژن *Cry*، بر اساس روش PCR با استفاده از ۷ جفت آغازگر اختصاصی برای ژن‌های *Cry I*، *Cry 1Ab*، *Cry 1Ac*، *Cry 1F*، *Cry 1I*، *Cry* 2 و *Cry 9* صورت گرفت. نتایج بررسی باندهای به‌دست آمده نشان داد که فراوانی ژن‌های مورد نظر در جدایه‌های مختلف، بسیار متفاوت بود؛ به‌طوری‌که برخی از ژن‌ها مانند *Cry 1Ab* بیشترین فراوانی را در جدایه‌های مورد بررسی داشتند، ولی ژن‌های *Cry I* و *Cry 1I* دارای کمترین فراوانی بودند. در برخی از جدایه‌ها، ژن‌ها در اندازه‌های متفاوت‌تر از سطح مورد انتظار، تکثیر شدند. نتایج این تحقیق، می‌تواند برای ردیابی جدایه‌های بومی Bt دارای ژن‌های *Cry* مؤثر روی حشرات، مفید واقع شود.

**واژگان کلیدی:** بررسی مولکولی، جدایه، ژن‌های *Cry*، *Bacillus thuringiensis*، PCR

## مقدمه

استفاده مداوم از حشره‌کش‌های شیمیایی، موجب بروز مقاومت در آفات و آلودگی‌های زیست‌محیطی شده است. از این‌رو، نیاز به کاربرد حشره‌کش‌های سازگار با محیط برای کاهش مقاومت به حشره‌کش‌ها، ضرورت یافته است. از طرف دیگر، تمایل به کاربرد عوامل میکروبی به‌عنوان حشره‌کش افزایش یافته که یکی از موفق‌ترین این عوامل، باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) است (Ammouneh *et al.*, 2013).

از سال ۱۹۰۱ که ایشی‌واتا، باکتری‌شناس ژاپنی از بدن یک لارو مرده کرم ابریشم، باکتری Bt را جداسازی کرد، تاکنون بیش از یک قرن است که مطالعات گسترده‌ای در زمینه نحوه عملکرد و اثر این باکتری انجام شده است. به‌تدریج باکتری مشابهی در ناحیه تورجینای آلمان، از پروانه آرد گندم جداسازی گردید و *Bacillus thuringiensis* نام‌گذاری شد. باکتری Bt، باسیل گرم مثبت و اسپورداری است که قادر است علیه آفات کشاورزی، همانند یک توکسین عمل کرده و در کنترل بیولوژیک آفات مورد استفاده قرار گیرد. کنترل بیولوژیک، روش جایگزینی است که در کاهش و یا حتی قطع کاربرد ترکیبات شیمیایی

محقق، بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران، ایران
**نویسنده مسئول مکاتبات:** noshinshazdeahmadi@yahoo.com

در کشاورزی نقش دارد. کنترل بیولوژیک آفات کشاورزی در طی سالیان اخیر، مورد توجه محققان بوده است (صادقی و همکاران، ۱۳۹۵). این باکتری در انسان غیربیماری‌زا بوده و عنصر فعال‌کننده برخی حشره‌کش‌های بیولوژیک را تشکیل می‌دهد. پس از آلوده شدن سیستم گوارشی لارو حشره به این باکتری، پروتئین‌های کریستالی در روده میانی لارو حشره حل شده و تحت تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک به یک جزء توکسین تبدیل می‌شوند. سلول‌های اپیتلیال روده حشره به سرعت متورم و تخریب می‌شوند. این باکتری، منجر به فلج شدن سیستم گوارشی لارو حشره شده و در نهایت، لارو را از تغذیه باز می‌دارد و در نهایت، عدم تغذیه لارو منجر به کاهش خسارات وارده از لارو به محصولات کشاورزی می‌شود (Hannay and Fitz, 1955). باکتری Bt با تولید کریستال‌های پروتئینی درون هاگی، ICP= Internal Crystal Protein، یا گاما اندوتوکسین و پروتئین‌های کریستالی، برای انواع لاروهای حشرات سمی می‌باشد. فعالیت حشره‌کشی Bt، مربوط به توانایی آن در سنتز مقادیر زیاد پروتئین‌های کریستالی درون هاگی است. این پروتئین‌ها، بالغ بر ۳۰- ۲۰ درصد از کل پروتئین باکتری را در طول اسپورزایی شامل می‌شوند. ژن‌های سازنده پروتئین‌های کریستالی، می‌توانند پلاسمیدی (روی پلاسمید) و یا کروموزومال (روی ژنوم باکتری) باشند (سیفی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۶). بر طبق پژوهش‌های مختلف، بررسی‌های اکولوژیک اخیر، پراکنش گسترده باکتری Bt را با خواص حشره‌کشی متفاوت در خاک‌های مناطق مختلف جهان نشان دادند. این شواهد بیان کردند که خاک، زیستگاه اصلی و یک منبع مطلوب برای سویه‌های باکتری Bt می‌باشد. محققان، مهم‌ترین عامل بقا و دوام این باکتری در خاک را مواد غذایی قابل دسترس می‌دانند (Martinez and Caballero, 2002).

دو نوع گاما اندوتوکسین وجود دارد، نوع *Cry* که کاملاً اختصاصی عمل می‌کند و نوع *Cyt* که به رسپتورهای اختصاصی نیاز ندارد. این دو خانواده از توکسین‌ها بر اساس توالی اسیدهای آمینه طبقه‌بندی شده‌اند. درجه تشابه بین پروتئین‌های *Cry* به‌شدت متغیر بوده و از ۹۵-۴۵ درصد متفاوت است. توکسین *Cry* با گیرنده‌های اختصاصی که روی سطح سلول‌های اپیتلیال روده حشره قرار دارند، برهم‌کنش داده و توسط پروتئازهای میزبانی، پس از اتصال به گیرنده اختصاصی فعال شده و منجر به تشکیل ساختارهای الیگومریک می‌شوند. اما، توکسین‌های *Cyt* به‌طور مستقیم با لیپیدهای غشا برهم‌کنش داده و به درون غشا وارد می‌شوند (توحیدی و همکاران، ۱۳۹۰).

از سال ۱۹۸۰، استفاده از باکتری Bt به‌دلیل کاربرد فراوان آن در مهندسی ژنتیک و گیاهان تراریخته به‌سرعت افزایش یافت. افزایش فشار انتخابی و تداوم استفاده از یک نوع توکسین خاص، منجر به بروز سطوحی از مقاومت در آفات شد. بدین ترتیب، برنامه‌های غربالگری در سراسر جهان، برای شناسایی سویه‌های جدید با فعالیت حشره‌کشی روی طیف وسیعی از آفات افزایش یافت (محمودی و همکاران، ۱۳۹۶).

تاکنون، روش‌های مختلفی برای جداسازی باکتری Bt، ارائه شده که عبارتند از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ساترن بلاتینگ، سروتایپینگ و روش زیست‌سنجی. در دهه‌های اخیر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، به‌طور گسترده‌ای جهت بررسی محتوای ژنی *Cry* در سویه‌های جمع‌آوری شده باکتری Bt به‌کار گرفته می‌شود (Martinez *et al*., 2005). شناسایی ژن‌های کریستالی این باکتری بر اساس PCR، اولین بار توسط پرز و همکاران (Juarez-Perez *et al*., 1997) انجام شد. آن‌ها نشان دادند که PCR، یک روش سریع و دقیق برای شناسایی ژن‌های *Cry* ناشناخته با فعالیت حشره‌کشی جدید می‌باشد.

شناسایی ژن‌های بومی با پتانسیل حشره‌کشی بالا در سویه‌های مختلف و همچنین با دامنه میزبانی جدید و امکان انتقال آن‌ها در سویه‌های نوترکیب از طریق مهندسی ژنتیک و روش‌های انتقال ژن، می‌تواند کمک بسیاری به کنترل میکروبی آفات و کاهش ظهور مقاومت در آن‌ها باشد (جهانگیری و همکاران، ۱۳۸۷). هدف از این پژوهش، جداسازی جدایه‌های بومی باکتری Bt از خاک مزارع توتون استان‌های مازندران و گلستان و بررسی مولکولی وجود انواع ژن‌های *Cry*، عامل تولید توکسین مؤثر روی آفات راسته بال‌پولکداران بود.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خاک مزارع توتون در دو استان گلستان، از شهرستان‌های کلاله، بندر گز، کردکوی، علی‌آباد کتول، گرگان، مینودشت و آزادشهر و مازندران، از شهرستان‌های ساری، سورک، قائمشهر، بهشهر، تیرتاش و نکا انجام گرفت. بدین ترتیب برای نمونه‌برداری، نمونه خاک از منطقه رایزوسفر و عمق ۵-۲ سانتی‌متری توسط بیلچه سترون جمع‌آوری و داخل کیسه‌های پلاستیکی سترون به آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش منتقل شدند. در مجموع، ۵۵ نمونهٔ خاک از مزارع توتون دو استان برای جداسازی باکتری Bt برداشت گردید.

### جداسازی اختصاصی باکتری Bt

برای جداسازی باکتری Bt از روش اختصاصی استات سدیم استفاده شد. به این منظور از محیط کشت مایع LB حاوی استات سدیم ۰/۲۵ مولار با pH برابر با هشت استفاده گردید. یک گرم از نمونه به مدت سه ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در ۲۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت داده شد. استات سدیم به‌طور اختصاصی مانع از جوانه‌زنی اسپورهای باکتریBt می‌شود و اسپورهای جوانه‌زده سایر باکتری‌های احتمالی موجود در خاک از بین رفته و فقط اسپورهای مقاوم و جوانه نزده Bt باقی ماندند. سپس یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت داده شده به مدت ۲۰ دقیقه تحت شوک حرارتی ۷۰- ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt مانند NA، T3 و LBA کشت داده شدند. پس از گذشت ۵-۳ روز از کشت، کلنی‌های باکتری بر اساس شکل ظاهری کلنی (دو هرمی) و رنگ (سفید مات) گزینش اولیه شده و درون آب‌نمک ۰/۹درصد در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Travers *et al.*, 1987).

### کشت باکتری و شناسایی میکروسکوپی

جدایه‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت ذکر شده، خالص‌سازی شدند. پس از گذشت ۵-۳ روز از کشت، با استفاده از روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و بر اساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) مورد شناسایی قرار گرفتند (گرایلی مرادی و همکاران، ۱۳۹۳ب؛ شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۸). شناسایی میکروسکوپی باکتری Bt از طریق میکروسکوپ نوری فازکنتراست با بزرگنمایی × ۱۰۰ (مدل Xion Inverso ساخت شرکت Euromex هلند) انجام شد.

### استخراج DNA جدایه‌های باکتری Bt

پس از تکثیر باکتری‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت، مقداری از نمونه کشت شده داخل یک میلی‌لیتر از محلول یک، حاوی Tris ۰/۰۱ مولار با (pH= 8)، EDTA ۰/۰۰۱ مولار و NaCl یک مولار قرار گرفت و سانتریفیوژ شد. سپس، به تشتک، ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج شامل Tris ۰/۰۲۵ مولار با pH= 8، EDTA ۰/۰۱ مولار، ساکارز ۲۵ درصد و لایزوزایم به میزان ۴ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس از محلول دو، حاوی NaOH ۱۰ مولار به میزان ۲ میلی‌لیتر، SDS ۱۰ درصد به میزان ۱۰ میلی‌لیتر و آب مقطر استریل به میزان ۸۸ میلی‌لیتر به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس NaCl ۵ مولار به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به آن افزوده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و به مقدار دو برابر محلول برداشته شده به آن، اتانول سرد با دمای ۲۰- درجه سلسیوس اضافه و سانتریفیوژ شد. پلت ایجاد شده با اتانول ۷۰ درصد دو بار شستشو شد و پس از خشک کردن، در محلول TE محتوی Tris به میزان ۱۰ میلی‌مولار و EDTA یک میلی‌مولار حل شد (Rolle *et al.*, 2005؛ شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۸).

سپس، برای تعیین کمیت DNAهای حاصل، از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV2100، ساخت شرکت یونیکو آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. برای ارزیابی کیفیت باندهای DNA، نمونه‌های DNA استخراج شده از هر جدایه، روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی ژل‌ها با محلول اتیدیوم بروماید، از ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک (مدل E-BOX-UX5) عکس‌برداری شده و کیفیت باندهای DNA استخراج شده، بررسی شد.

### انتخاب آغازگرهای اختصاصی

برای آنالیز و شناسایی انواع ژن‌های *Cry* مؤثر بر آفات بال‌پولکداران Lepidoptera، از هفت جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده توسط (Seifinejad *et al*., 2008) به‌کار گرفته شد (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Characteristics of the specific primers used in this research

| آغازگر Primer | توالی Sequence | موقعیت در توالی Positions | ژن Gene(s) | اندازه محصول Product size (bp) | شماره دسترسی بانک ژن GenBank Accession No. |
|---|---|---|---|---|---|
| *UNcry1(+)*<br>*UNcry1(-)* | 5'-tracrhtddbdgtattagat-3'<br>5'-mdatytctakrtcttgacta-3' | 726<br>2268 | *cryI* | 1500-1600 | |
| *SPcry1Ab(+)*<br>*UNcry1(-)* | 5 '- cggatgctcatagaggagaa-3'<br>5'-mdatytctakrtcttgacta-3' | 940 | *cry1Ab* | 1,371 | M13898 |
| *SPcry1Ac(+)*<br>*UNcry1(-)* | 5 '- ggaaactttctttttaatgg-3 '<br>5'-mdatytctakrtcttgacta-3' | 1452 | *cry1Ac* | 844 | M11068 |
| *SPcry1F(+)*<br>*UNcry1(-)* | 5 '- gatttcaggaagtgattcat-3 '<br>5'-mdatytctakrtcttgacta-3' | 1302 | *cry1F* | 967 | M63897 |
| *SPcry1I(+)*<br>*SPcry1I(-)* | 5 '-acaatttacagcttattaag-3 '<br>5 '-ctacatgttacgctcaatat-3' | 1027<br>2141 | *cry1I* | 1000 | X62821 |
| *UNcry2(+)*<br>*UNcry2(-)* | 5 '-gttattcttaatgcagatgaatggg-3 '<br>5 '-cggataaaataatctgggaaatagt-3 ' | 726-750 , 1402-1426,<br>1444-1468, 2120-2144,<br>2695-2719, 3359-3383 | *All cry2 genes* | 701<br>701<br>689 | M31738<br>X55416<br>X57252 |
| *UNcry9(+)*<br>*UNcry9(-)* | 5 '- cggtgttactatt agcgagggcgg-3 '<br>5 '- gtttgagcc gcttcacagcaatcc-3 ' | 2774–2797, 3104–3127<br>2272–2295, 2602–2625<br>4354–4377, 4681–4704<br>2338–2361, 2668–2691 | *All cry9 genes* | 351-354 | X58120<br>X75019<br>Z37527<br>D85560 |

### ردیابی مولکولی ژن‌های *Cry* و زیرگروه‌های آن در جدایه‌های بومی Bt

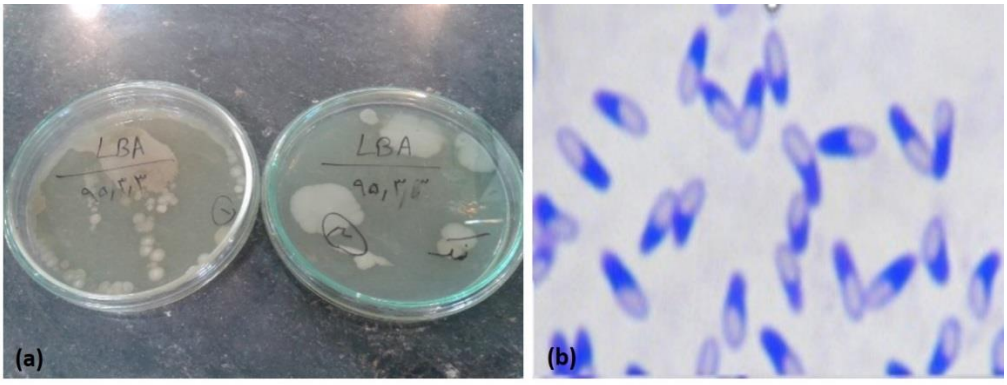
برای شناسایی ژن‌های ذکر شده، واکنش PCR با استفاده از هفت جفت آغازگر اختصاصی و بر طبق روش (Juarez- Perez *et al*., 1997) انجام شد. برای ایجاد بهترین شرایط PCR و محاسبه دمای آنیلینگ پرایمرها، غلظت‌های مناسب اجزای تشکیل‌دهنده PCR و دماهای آن‌ها، آزمون گرادیان غلظت انجام گرفت و واکنش در چند مرحله بهینه‌سازی شد. واکنش PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، عبارت بود از آب مقطر استریل به میزان ۱۴ میکرولیتر، PCR Buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۱۰ ماکرومولار به میزان ۰/۷ میکرولیتر، آغازگرهای رفت (F) و برگشت (R) هر یک به میزان ۲ میکرولیتر، Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۳ میکرولیتر، $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار به میزان ۱/۵ میکرولیتر و DNA باکتری Bt به میزان ۲ میکرولیتر. مراحل تکثیر واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل MJ-MINI، ساخت شرکت BIO-RAD) برای ۳۵ سیکل، بدین شرح انجام پذیرفت: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۵-۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس.

پس از اتمام مراحل واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر، محصول تکثیر شده در ژل آگارز ۲ درصد رانده شد و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و فراوانی وجود انواع ژن‌های *Cry* و زیرگروه‌های آن‌ها در جدایه‌های باکتری Bt بومی مزارع توتون در استان‌های مازندران و گلستان، ردیابی شده و الگوهای باندی به‌دست آمده مشاهده و ثبت شدند.

## نتایج

### جداسازی و شناسایی جدایه‌ها بر اساس شاخص‌های مورفولوژیک

در این پژوهش، پس از نمونه‌برداری از خاک‌های مزارع توتون در استان‌های مازندران و گلستان، با استفاده از روش گزینش انتخابی توسط استات سدیم، از ۵۵ نمونه خاک جمع‌آوری شده، تعداد ۹۰ جدایه بومی باکتری Bt بر اساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و داخل آب نمک ۰/۹ درصد تا زمان استفاده بعدی نگهداری شدند. پس از رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی‌بلو، شناسایی نهایی جدایه‌ها بر مبنای شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) انجام شد. تصاویر نمونه‌های Bt جداسازی شده از خاک با روش استات سدیم نشان داد که کلنی این باکتری به رنگ سفید مات روی محیط کشت ایجاد می‌شود. همچنین، توسط روش رنگ‌آمیزی گرم، کریستال‌های Bt به رنگ تیره و اسپورها به رنگ روشن مشخص شدند (شکل ۱).




شکل ۱- نمونه‌های Bt جداسازی شده از خاک با روش استات سدیم (a) و با رنگ آمیزی گرم (b)

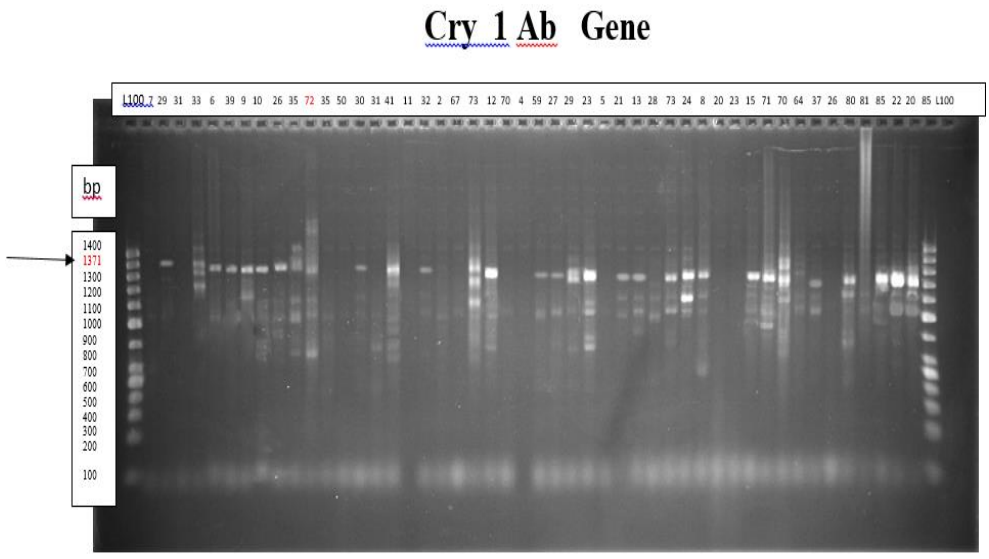
Fig. 1. Bt samples isolated from soil by sodium acetate method (a) and by gram staining (b)

### شناسایی و بررسی فراوانی جدایه‌های دارای انواع ژن‌های *Cry* و زیرگروه‌های آن به تفکیک استان

پس از بهینه‌سازی و انجام مراحل استخراج DNA، جدایه‌های Bt با استفاده از آغازگرها تحت واکنش قرار گرفتند. از بین آن‌ها، برخی از جدایه‌ها، حاوی ژن‌ها در اندازه‌های مورد انتظار (۱۵۰۰-۱۳۰۰bp) بودند و سایر جدایه‌ها نیز قطعات کوچک‌تر، حدود ۶۰۰-۵۰۰bp، تولید کردند که نیازمند توالی‌یابی و بررسی‌های بیشتر است (شکل‌های ۲ و ۳). پتانسیل سمیت جدایه‌های Bt به نوع و زیرگروه‌های ژن *Cry* آن وابسته است (Apaydin *et al.*, 2005).

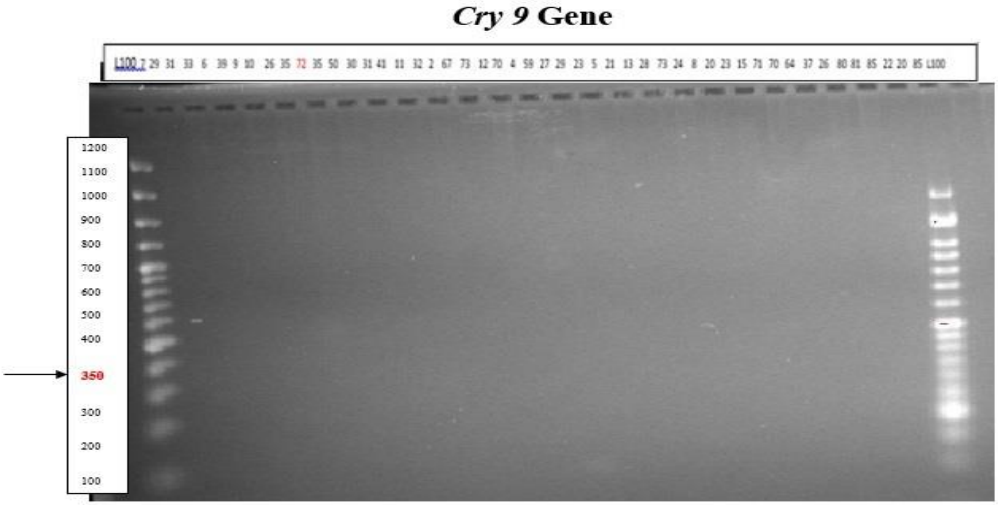
### فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt بومی استان مازندران

فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt بومی جداسازی شده از مزارع توتون در سطح استان مازندران عبارت بودند از ژن *Cry 1I* با فراوانی ۱۸/۷۵ درصد، ژن *Cry1* با فراوانی ۱۶/۶ درصد، ژن *Cry 9* با فراوانی ۲۵ درصد، ژن *Cry 1Ac* با فراوانی ۲۲/۹ درصد، ژن *Cry 1Ab* با فراوانی ۶۴/۵ درصد، ژن *Cry 1F* با فراوانی ۳۱/۲۵ درصد و ژن *Cry 2* با فراوانی ۵۴/۱ درصد (شکل ۴).




شکل ۲- نمونه‌هایی از جدایه‌های Bt متعلق به استان مازندران که حاوی ژن *Cry 1Ab* با تولید باند ۱۳۷۱bp مورد انتظار بودند.

Fig. 2. Samples of Bt isolates from Mazandaran province containing the *Cry 1Ab* gene producing the expected 1371bp product band.




شکل ۳- نمونه‌هایی از جدایه‌های Bt متعلق به استان گلستان که هیچ‌یک حاوی ژن *Cry 9* با اندازه باند مورد انتظار ۳۵۰bp نبودند.

Fig. 3. Samples of Bt isolates from Golestan province, none of which contained the *Cry 9* gene with the expected band size of 350bp.

بر طبق نتایج فوق، در جدایه‌های بومی موجود در مزارع توتون استان مازندران، ژن *Cry 1Ab* دارای بیشترین فراوانی بود و در اکثر جدایه‌ها یافت شد، اما ژن‌های *Cry 1I* و *CryI* دارای کمترین فراوانی بودند و در برخی از جدایه‌ها یافت نشدند. در برخی از جدایه‌ها، ژن‌های در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. این جدایه‌ها، ممکن است که محتوی یک ژن جدید یا ژن‌هایی باشند که برای کنترل بیولوژیک آفات و مدیریت مقاومت آفات، امیدبخش باشند (جدول ۲).

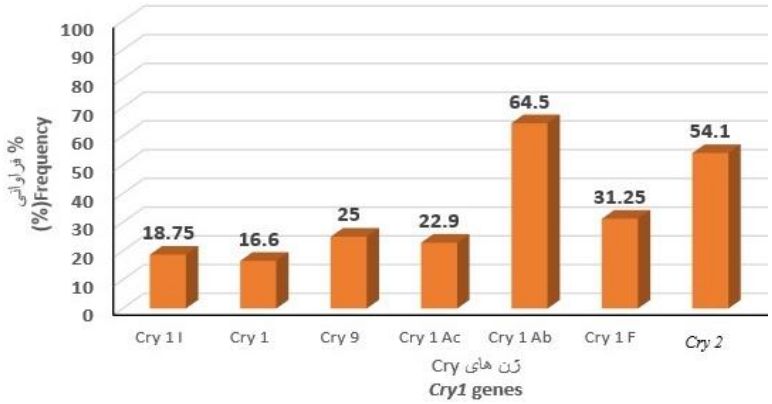
### فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt بومی استان گلستان

فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt جداسازی شده از مزارع توتون در سطح بومی استان گلستان عبارت بودند از ژن *Cry 1Ab* با فراوانی ۴۰/۵ درصد، ژن *Cry 1Ac* با فراوانی ۱۴/۲ درصد، ژن *Cry 1F* با فراوانی ۲۱ درصد، ژن *Cry I* با فراوانی ۱۰ درصد، ژن *Cry 2* با فراوانی ۱۵/۲ درصد، ژن *Cry 1* با فراوانی ۵/۸ درصد و ژن *Cry 9* با فراوانی صفر درصد.

جدول ۲- شماره جدایه‌ها، مکان‌های نمونه‌برداری و ژن‌های شناسایی شده *Cry* در جـدایه‌های باکتری Bt جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان

Table 2. Isolate numbers, sampling locations, and identified *Cry* genes in Bt isolates collected from Mazandaran and Golestan provinces

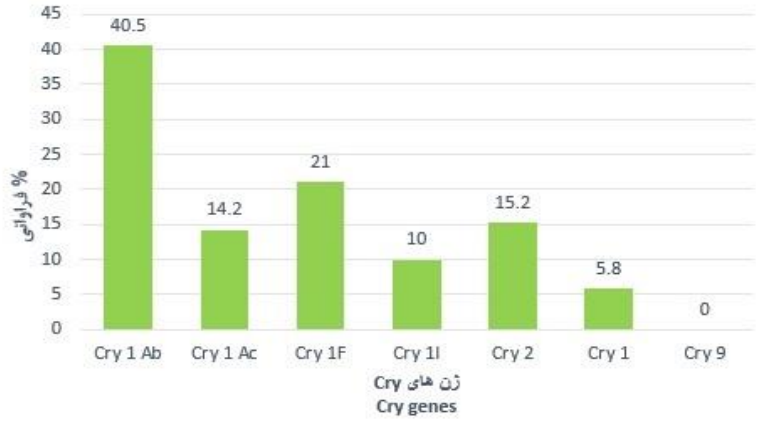
| شماره جدایه No. | استان Province | Sampling Location | منطقه نمونه‌برداری | ژن‌های *Cry* شناسایی شده *Cry* genes recognized | شماره جدایه No. | Sampling Location | منطقه نمونه‌برداری | ژن‌های *Cry* شناسایی شده *Cry* genes recognized |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 2 – *Cry* F – *Cry* 9 | 2 | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 1Ab – *Cry* 1Ac – *Cry* 1I |
| 3 | | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 2 – *Cry* 1Ac – *Cry* 1I | 4 | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1Ac |
| 5 | | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* F- *Cry* 1 Ab | 6 | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 2 – *Cry* F – *Cry* 1 |
| 7 | | Tir Tash | تیرتاش | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 Ac | 8 | Neka | نکا | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab- *Cry* 1I |
| 9 | | Neka | نکا | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9 | 10 | Neka | نکا | *Cry* 2 – *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 |
| 11 | | Neka | نکا | *Cry* 2 – *Cry* F- *Cry* 1 Ab | 12 | Neka | نکا | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 Ac |
| 13 | | Neka | نکا | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9- *Cry* 1 | 14 | Neka | نکا | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab- *Cry* 1I |
| 15 | | Neka | نکا | *Cry* 2- *Cry* F- *Cry* 1 Ac | 16 | Surak | سورک | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab |
| 17 | | Surak | سورک | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9 | 18 | Surak | سورک | *Cry* 2- *Cry* F |
| 19 | | Surak | سورک | *Cry* 2 – *Cry* 1 Ac | 20 | Surak | سورک | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9 |
| 21 | | Surak | سورک | *Cry* 2 – *Cry* 1 Ab | 22 | Surak | سورک | *Cry* F- *Cry* 1 Ab- *Cry* 1I |
| 23 | مازندران Mazandaran | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* F- *Cry* 1 | 24 | Sari | ساری | *Cry* 1Ab- *Cry* 1 Ac |
| 25 | | Sari | ساری | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1- *Cry* 1I | 26 | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab |
| 27 | | Sari | ساری | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9- *Cry* 1I | 28 | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* F- *Cry* 1I |
| 29 | | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab | 30 | Sari | ساری | *Cry* F- *Cry* 1 Ab |
| 31 | | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* F- *Cry* 1 | 32 | Sari | ساری | *Cry* 1 Ab- *Cry* 9- *Cry* 1I |
| 33 | | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* 1 Ac | 34 | Sari | ساری | *Cry* 2- *Cry* 1 Ab |
| 35 | | Behshahr | بهشهر | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 | 36 | Behshahr | بهشهر | *Cry* 2- *Cry* 9- *Cry* 1 Ab |
| 37 | | Behshahr | بهشهر | *Cry* F- *Cry* 1 Ab | 38 | Behshahr | بهشهر | *Cry* 2- *Cry* 9- *Cry* 1I |
| 39 | | Behshahr | بهشهر | *Cry* F- *Cry* 9 | 40 | Behshahr | بهشهر | *Cry* 2 – *Cry* 1 Ac |
| 41 | | Behshahr | بهشهر | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 | 42 | Behshahr | بهشهر | *Cry* 2- *Cry* 1 Ac |
| 43 | | Qaem Shahr | قائم شهر | *Cry* 2- *Cry* 1 Ac | 44 | Qaem Shahr | قائم شهر | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1I |
| 45 | | Qaem Shahr | قائم شهر | *Cry* F- *Cry* 1 | | | | |
| 46 | | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1 Ab- *Cry* 2 | 47 | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1 Ac |
| 48 | | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1 Ab | 49 | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1 F- Cry 1 |
| 50 | | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 2 | 51 | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1 Ab |
| 52 | | Kordkuy | کردکوی | *Cry* 1F | 53 | Bandar Gaz | بندرگز | *Cry* 1 Ac |
| 54 | | Bandar Gaz | بندرگز | | 55 | Bandar Gaz | بندرگز | *Cry* 2 |
| 56 | | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 1 Ab | 57 | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* F |
| 58 | | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 1 Ac | 59 | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 1 Ab |
| 60 | | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | | 61 | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 1 Ab |
| 62 | | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 2 | 63 | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 1 Ab |
| 64 | | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* F | 65 | Ali Abad Katul | علی آباد کتول | *Cry* 2 |
| 66 | | Azadshahr | آزادشهر | *Cry* 1 Ab | 67 | Azadshahr | آزادشهر | *Cry* 1 F |
| 68 | گلستان Golestan | Azadshahr | آزادشهر | *Cry* 1 Ab | 69 | Azadshahr | آزادشهر | |
| 70 | | Azadshahr | آزادشهر | *Cry* 1 Ab | 71 | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1 Ac |
| 72 | | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1F | 73 | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1 Ab- *Cry* 1 |
| 74 | | Minudasht | مینودشت | | 75 | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1 Ab |
| 76 | | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1 Ac | 77 | Minudasht | مینودشت | Cry 1F |
| 78 | | Minudasht | مینودشت | *Cry* 2 | 79 | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1 Ab |
| 80 | | Minudasht | مینودشت | *Cry* 1F | 81 | Gorgan | گرگان | *Cry* 1 Ab |
| 82 | | Gorgan | گرگان | *Cry* 1 Ac- *Cry* 1 | 83 | Gorgan | گرگان | *Cry* 1 Ab |
| 84 | | Gorgan | گرگان | *Cry* 1 Ab - *Cry* 2 | 85 | Gorgan | گرگان | *Cry* 1F |
| 86 | | Gorgan | گرگان | *Cry* 1F | 87 | Gorgan | گرگان | *Cry* 1 Ab |
| 88 | | Kalaleh | کلاله | *Cry* 1 Ac | 89 | Kalaleh | کلاله | *Cry* 1F |
| 90 | | Kalaleh | کلاله | Cry 1 Ab | | | | |




شکل ۴- درصد فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt بومی استان مازندران

Fig. 4. *Cry* genes frequency (Percentage) in detected Bt isolates from Mazandaran province

بر طبق نتایج فوق، جدایه‌های Bt بومی مزارع توتون در استان گلستان، دارای فراوانی کمتری از ژن‌های *Cry* بودند. به‌طوری‌که، بیشترین فراوانی مربوط به ژن *Cry 1Ab* با ۴۰/۵ درصد بوده است. در حالی‌که، فراوانی سایر ژن‌ها به‌طور محسوسی کاهش یافته است. کمترین فراوانی مربوط به ژن *Cry 1* با ۵/۸ درصد و نیز ژن *Cry 9* با صفر درصد بوده است. ژن *Cry 9* در هیچ یک از جدایه‌های Bt بومی استان گلستان یافت نشد (شکل ۵).




شکل ۵- فراوانی ژن‌های *Cry* در جدایه‌های Bt بومی استان گلستان

Fig. 5. *Cry* genes frequency in detected Bt isolates from Golestan province

## بحث

Bt، یک باکتری گرم مثبت، خاکزی و اسپورزا بوده که پروتئین‌های کریستالی سمی برای حشرات تولید می کند. تاکنون بیش از ۳۰۰ پروتئین کریستالی جداسازی و تعیین توالی شده‌اند که بر اساس شباهت در توالی به ۵۳ گروه مختلف دسته‌بندی شده‌اند (Keshavarzi, 2008). با توجه به امکان وجود جدایه‌های جدید، شناسایی Btهای جدید در مناطق مختلف کشور با روش‌های سریع و مطمئن که در تحقیق حاضر نیز مورد ارزیابی قرار گرفت، امری بدیهی است. همچنین، شناسایی باکتری‌ها و شناسایی ژن‌های جدید در آن‌ها، می‌تواند در تولید آفت‌کش‌های جدید و عدم ایجاد مقاومت به این ژن‌ها بسیار مؤثر باشد (Kaur, 2006).

پس از معرفی و توصیف روش PCR برای شناسایی ژن‌های *Cry* باکتری Bt، این روش را می‌توان به‌عنوان یک تکنیک مولکولی دقیق برای پیش‌بینی فعالیت حشره‌کشی جدایه‌های Bt پیشنهاد نمود. از این تکنیک، برای تکثیر بخش‌های خاصی

از DNA و همچنین، تعیین وجود و یا عدم وجود یک ژن هدف استفاده می‌شود (Carrozi *et al*., 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، روشی سریع، دقیق و مطمئن برای ردیابی ژن‌های مختلف در باکتری Bt است (Cinar *et al*., 2008). روش‌های سنتی زیست‌سنجی حشرات، نیازمند پرورش تعداد زیادی حشره بوده و انجام تیمارهای مختلف نیاز به زمان زیادی دارد. از این‌رو، شناسایی مولکولی جدایه‌های مؤثر می‌تواند به‌خوبی، جایگزین روش‌های سنتی گردد. همچنین، با این روش می‌توان از ساختار ژن‌های *Cry* در جدایه‌های بومی آگاهی یافت و قابلیت حشره‌کشی جدایه‌ها را پیش‌بینی نمود (Porcar and Juarez-perez, 2003). در تحقیق حاضر، ۹۰ جدایه بومی باکتری Bt، از ۵۵ نمونه خاک مختلف از استان‌های مازندران و گلستان جداسازی گردید. با توجه به عدم وجود یک روش فنوتیپی دقیق برای بررسی وجود ژن‌های کریستالی (*Cry*)، همچنان روش ژنوتیپی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

امروزه در سراسر جهان، مجموعه‌های بزرگی از جدایه‌های Bt نگهداری می‌شوند. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt نشان داد که ۲۰ تا ۹۶ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به‌طور تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده کریستال بودند (Travers *et al*., 1987). در تحقیقی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ۹ ژن *Cry 1* را در ۱۶۳ جدایه Bt جداسازی شده از انبار غلات مورد بررسی قرار دادند. ژن *Cry 1Ab* با ۴۷ درصد دارای بیشترین و ژن‌های *Cry 1G* با ۲ درصد و *Cry 1E* با یک درصد فراوانی دارای کمترین فراوانی بودند (Kim *et al*., 1998). در تحقیق دیگری، از ۷۰ جدایه باکتری Bt، ۳۴ جدایه با فراوانی ۴۹ درصدی دارای ژن *Cry 1* بودند. ژن *Cry 1I* با فراوانی ۱۰۰ درصدی دارای بیشترین فراوانی بود و ژن‌های *Cry 1B*، *Cry 1G*، *Cry 1H* و *Cry 1K* اصلاً یافت نشدند. همچنین، ژن‌های *Cry 1C*، *Cry 1E* و *Cry 1J* در برخی از جدایه‌ها در اندازه‌های غیرقابل انتظار مشاهده شدند (Seifinejad *et al*., 2008). در تحقیقی در کشور هند، با بررسی جدایه‌های Bt مؤثر روی حشرات راسته‌های بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان، ژن *Cry 1I* با بیشترین فراوانی به میزان ۷۰/۵ درصد مشاهده شد (Pooja *et al*., 2013).

در کشور سوریه از ۴۰ جدایه Bt جداسازی شده از لاروهای آلوده در همه جدایه‌ها، دو ژن *Cry 1Aa* و *Cry 1Ac* مشاهده شدند. پس از آن، ژن‌های *Cry 1I* در ۳۷ جدایه و *Cry 1Ab* در ۳۴ جدایه با بیشترین فراوانی و ژن *Cry 1D* در چهار جدایه با کمترین فراوانی مشاهده شدند (Nariman, 2007).

در تحقیق حاضر، ژن *Cry 1 Ab* بیشترین فراوانی را در بین سایر ژن‌های *Cry* مورد بررسی در این تحقیق داشت، به‌طوری‌که ۶۴/۵ درصد از جدایه‌های Bt حاصل از مزارع توتون استان مازندران و ۴۰/۵ درصد از جدایه‌های Bt متعلق به مزارع توتون استان گلستان، حاوی ژن *Cry 1 Ab* بودند. ۵۴/۱ درصد از جدایه‌های Bt موجود در مزارع توتون استان مازندران و ۲۱ درصد از جدایه‌های Bt مستخرج از مزارع توتون استان گلستان، دارای ژن *Cry 1F* بودند. ژن *Cry 1 Ac* در ۲۲/۹ درصد از جدایه‌های Bt استان مازندران و ۱۴/۲ درصد از جدایه‌های استان گلستان مشاهده گردید. ۱۸/۷۵ درصد از جدایه‌های Bt استان مازندران و ۱۰ درصد از جدایه‌های استان گلستان، دارای ژن *Cry I* بودند. ۱۶/۶ درصد از جدایه‌های استان مازندران و ۵/۸ درصد از جدایه‌های استان گلستان، دارای ژن *Cry 1* بودند. ۲۵ درصد از جدایه‌های استان مازندران، دارای ژن *Cry 9* بودند، در حالی‌که این ژن در هیچ یک از جدایه‌های Bt متعلق به استان گلستان یافت نشد (جدول ۲). در پژوهشی، ضمن بررسی خصوصیات ژنی جدایه‌های Bt جداسازی شده از خاک‌های نواحی جنگلی استان گلستان مشخص گردید که ژن‌های *Cry 1Ab*، *Cry 2* و *Cry 1F* در اکثر جدایه‌ها یافت شده و دارای بیشترین فراوانی بودند (شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۸)؛ این یافته‌ها با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در پژوهش انجام شده توسط (گرایلی مرادی و همکاران، ۱۳۹۳الف)، مشخص گردید که بر اساس شاخص‌های مولکولی، بیشترین تعداد و تنوع از زیرگروه‌های ژنی *Cry1* در خاک‌های زراعی و کمترین تعداد در خاک‌های بدون پوشش گیاهی مشاهده شد. همین محققین نتیجه‌گیری کردند که خاک‌های زراعی، به دلیل برخورداری از پوشش گیاهی و نیز، تنوع زیستی

مناسب برای حشرات و میکروارگانیسم‌های خاک و در نتیجه، فراوانی میزبانی بیشتر برای باکتری Bt، منبع مناسب‌تری برای جداسازی باکتری Bt می‌باشد، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت. در پژوهش دیگری، از تعداد ۲۲۹۲ نمونه خاکی جمع‌آوری شده از ۲۸ استان مختلف ایران، تعداد ۲۸۴۴۵ کلنی باسیلی شکل جدا کردند که از بین آن‌ها، ۱۲۸ جدایه، کریستال تولید کردند (Salehi Jouzani *et al*., 2008). نتایج حاصل از کلیه بررسی‌ها و تحقیقات انجام شده در داخل و خارج از کشور، نشان‌دهنده فراوانی بالای باکتری Bt در نمونه‌های خاک مناطق مختلف است. از این‌رو، در تحقیق حاضر نیز خاک‌های مزارع توتون در استان‌های مازندران و گلستان برای جداسازی Bt بررسی شد و تعداد قابل توجهی جدایه Bt از خاک‌های مزارع توتون جداسازی گردید که نشان‌دهنده فراوانی بالای آن در نمونه‌های خاکی است.

در پژوهش دیگری توسط ریاضی و همکاران (۱۳۸۸)، ۵۰ جدایه Bt بومی استان‌های خراسان و همدان، با استفاده از ۱۴ پرایمر اختصاصی برای ژن‌های *Cry 1a*، *Cry 1b*، *Cry 1C*، *Cry 1d*، *Cry 1e*، *Cry 1f* و *Cry 1g* با استفاده از روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن *Cry 1a* دارای بیشترین فراوانی بوده است، به‌طوری‌که ۸۰ درصد جدایه‌های Bt استان خراسان و ۶۴ درصد جدایه‌های Bt استان همدان، حاوی ژن *Cry 1a* بودند. ژن‌های *Cry 1d*، *Cry 1f* و *Cry 1g* دارای فراوانی صفر درصد بودند؛ بدان معنی که این سه ژن در هیچکدام از جدایه‌های Bt یافت نشدند؛ این یافته‌ها تا حدودی با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مغایرت داشت. احتمالاً تفاوت‌های مشاهده شده در محتویات ژنتیکی ژن‌های *Cry* ناشی از تفاوت اکولوژیک مناطق مختلف از جمله پوشش گیاهی، تنوع حشرات میزبان و تنوع فون خاک در نواحی مختلف جغرافیایی باشد (Aramideh *et al*., 2010؛ Kim *et al*., 1998).

بر اساس نتایج بررسی مولکولی به‌دست آمده از تحقیق حاضر، ژن *Cry 1Ab* دارای بیشترین فراوانی و ژن‌های *Cry 1I* و *Cry I* با کمترین فراوانی مشاهده شدند. همان‌طور که از نتایج استنباط می‌شود، محتوای ژنتیک بر خلاف شباهت‌های جزئی، تفاوت‌های بسیاری با یکدیگر دارند. مقایسه این نتایج نشان‌دهنده آن است که نواحی جغرافیایی مختلف بر روی تنوع محتویات ژن *Cry* در جدایه‌های باکتری Bt اثر می‌گذارد (Tuba Etinkaya, 2002).

امروزه به دلیل درک صحیح از مزایای کنترل بیولوژیک در کشورهای مختلف جهان، میزان مبادلات تجاری سموم بیولوژیک به بیش از ۳۰۰ میلیون دلار می‌رسد و بیش از هزاران فرمولاسیون و محصولات مختلف تجاری به‌عنوان سموم و کودهای بیولوژیک در بازارهای جهانی موجود است، که از بین آن‌ها، باکتری Bt به دلیل اهمیت بالا در کنترل آفات خاص و عدم تأثیر سوء بر انسان و محیط زیست، به یک عامل بیولوژیک بسیار مهم تبدیل شده و اکنون، سموم حاصل از باکتری Bt، عمده‌ترین سموم بیولوژیک مورد کاربرد در جهان، بیش از ۸۰ درصد می‌باشند (صادقی و همکاران، ۱۳۹۵). شرکت‌های تجاری بسیاری با هدف یافتن جدایه‌هایی با دامنه میزبانی متفاوت و یا جدایه‌های دارای سمیت بیشتر روی یک یا چند آفت در جداسازی جدایه‌های جدید Bt سرمایه‌گذاری می‌کنند. این پژوهش‌ها، تمایل به استفاده از Bt را به منزله یک راهکار ایمن محیطی در مقایسه با بسیاری از حشره‌کش‌های شیمیایی و همچنین به منزله راهکاری برای مدیریت مقاومت آفات به حشره‌کش‌های شیمیایی افزایش داده است (Hongyu *et al*., 2000). با وجود همه پیشرفت‌هایی که در جهان در مورد باکتری Bt انجام شده، متأسفانه تحقیقات محدود و اندکی در مورد جدایه‌های بومی این باکتری و تولید فرمولاسیون‌های بیولوژیک از آن‌ها در ایران صورت گرفته است. بنابراین، شناخت جدایه‌های باکتری Bt بومی مناطق مختلف، همچنین بررسی‌های ژنتیکی آن‌ها به منظور تشخیص ژن‌های مربوطه، به خصوص ژن‌های جدید ناشناخته و توالی‌یابی و شناخت فعالیت آن‌ها جهت تولید سموم بیولوژیک، امری مهم و ضروری می‌باشد (سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۹۹).

## منابع References

**توحیدی، ف.، ناظمی، ع. و خاتمی‌نژاد، م.ر. ۱۳۹۰.** جداسازی و شناسایی مولکولی انواع ژن‌های *Cry* در باسیلوس تورینجینسیس‌های جدا شده از خاک‌های غرب مازندران. مجله زیست‌فناوری دانشگاه آزاد اسلامی ۳(۱۱): ۶-۱.

**جهانگیری، ر.، صالحی‌جوزانی، غ.، سعید، خ.ع.، مصدق، ح. و نظریان، ا. ۱۳۸۷.** شناسایی ژن‌های جدید *Cry* در جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* ایران. خلاصه مقالات دهمین کنگره ژنتیک ایران. ۴۶۳ صفحه.

**ریاضی، ا.، زرگری، ک. و کشاورزی، م. ۱۳۸۸.** شناسایی انواع ژن‌های *Cry1* در نمونه‌های *Bacillus thuringiensis* جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان و همدان. نشریه دانش زیستی ایران ۴(۲): ۲۸-۱۹.

**سلطانی‌نژاد، پ.، مهرخو، ف. و راشکی، م. ۱۳۹۹.** شناسایی ژن‌های *Cry* ویژه بالپولکداران در سویه‌های ایرانی *Bacillus thuringiensis*. بیست و یکمین کنگره ملی و نهمین کنگره بین‌المللی زیست‌شناسی ایران.

**سیفی‌نژاد، ع.، بی‌همتا، م.ر.، امیدی، م. و صالحی‌جوزانی، غ.ر. ۱۳۸۶.** ژنومیکس عملکردی باکتری باسیلوس تورینجینسیس (توکسین‌های *Cry*). نشریه ژنتیک نوین ۳(۱۰): ۲۴-۱۷.

**شازده‌احمدی، م.، سجادی، ا. و شهادتی مقدم، ز. ۱۳۹۸.** بررسی برخی خصوصیات ژنی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان. مجله گیاه‌پزشکی کاربردی ۸(۱): ۳۷-۲۵.

**صادقی، م. صادقی، ا. و کریمی، ا. ۱۳۹۵.** مروری بر باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) به‌عنوان آفت‌کش زیستی. مجله ایمنی زیستی ۹(۲): ۱۱۴-۹۹.

**گرایلی مرادی، ف.، محمدی شریف، م.، هادی‌زاده، ع. و بابایی‌زاد، و. ۱۳۹۳ الف.** تنوع باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های دارای پوشش گیاهی مختلف. مجله محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران ۶۷ (۳): ۳۲۱–۳۱۳.

**گرایلی مرادی، ف.، محمدی شریف، م.، هادی‌زاده، ع. و بابایی‌زاد، و. ۱۳۹۳ ب.** ردیابی مولکولی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های دارای پوشش گیاهی مختلف. مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ۳(۱): ۵۴–۴۱.

**محمودی، ر.، ایرجیان، غ.ر.، جوادی، ا. و پناهی‌کوخدان، ا. ۱۳۹۶.** بررسی وجود ژن *Cry* در باسیلوس تورینجینسیس‌های جدا شده از خاک. مجله ارمغان دانش ۲۲(۲): ۲۸۰–۲۷۱.

**Ammouneh, H., Ismail, H., Al-bedda, A., Abou Baker, N. and Harba, M. 2013.** Characterization of lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from infected larvae. Biocontrol Science and Technology 23: 607-623.

**Apaydin, O., Yenidunya, A., Harsa, S. and Gunes, H. 2005.** Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 285-292.

**Aramideh, Sh., Safaralizadeh, M.H., Pourmirza, A.A., Rezazadeh Bari, M., Keshavarzi, M. and Mohseniazar, M. 2010.** Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from west Azerbaijan province of Iran. African Journal of Microbiology Research 4: 1224-1229.

**Carrozi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. and Koziel, M. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Chain Reaction product profiles. Applied and Environmental Microbiology 57: 3057-3061.

**Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A.F., Harsa, S. and Gunes, H. 2008**. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. Journal of Applied Microbiology 104: 515-525.

**Hannay, C.L. and Fitz, J.P. 1955.** The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Ber. Canadian Journal of Microbiology 1: 694-710.

**Hongyu, Z., Ziniu, Y. and Wangxi, D. 2000.** Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. Crop Protection 19: 449-454.

**Juarez- Perez, V.M., Ferrandis, M.D. and Frutus, R. 1997.** PCR- based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis Cry* genes. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 2997-3002.

**Kaur, S. 2006.** Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 233-253.

**Keshavarzi, M. 2008**. Isolation, Identification and Differentiation of Local *Bacillus thuringiensis* Strains. Journal of Agriculture and Science Technology 10: 493-499.

**Kim, H.S., Lee, D.W., Woo, S.D., Yu, Y.M. and Kang, S.K. 1998.** Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. Current Microbiology 37: 195-200.

**Martinez, C., Ibarra, J.E and Caballero, P. 2005.** Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 91-97.

**Martínez, C. and Caballero, P. 2002.** Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. Journal of Applied Microbiology 92: 745-752.

**Nariman, A.H. 2007.** PCR Detection of *cry* Genes in Local *Bacillus thuringiensis* Isolates. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 1(4): 461-466.

**Porcar, M. and Juarez-Perez, V. 2003.** PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews 26: 419-432.

**Pooja, A.S., Krishnaraj, P.U. and Prashanthi, S.K. 2013.** Profile of cry from native *Bacillus thuringiensis* isolates and expression of *cry1I*. African Journal of Biotechnology 12: 3545-3562.

**Rolle, R.L., Ejiofor, A. and Johnson, T.L. 2005.** Determination of the plasmid size and location of δ-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. African Journal of Biotechnology 4: 580-585.

**Salehi Jouzani, G., Pourjan Abad, A., Seifinejad, A., Marzban, R., Kariman, K. and Maleki, B. 2008.** Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 83-94.

**Seifinejad, A., Salehi Jouzani, G.R. and Abdmishani, C. 2008.** Characterization of Lepidoptera– active *Cry* and *Vip* genes in Iranian Bt strain collection. Biological Control 44: 216-226.

**Travers, R.S., Martin, P.A.W. and Reichelderfer, C.F. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp*. Applied and Environmental Microbiology 53: 1263-1266.

**Tuba Etinkaya, F. 2002.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* and Investigation of Its Crystal Protein Genes. Izmir Institute of Technology İzmir, Turkey.

# Molecular detection of *Cry* genes in the *Bacillus thuringiensis* native isolates from the soils of tobacco fields of Mazandaran and Golestan provinces

**M. Shazdeahmadi***

Received: 6 Jun., 2024 Accepted: 8 Aug., 2024

**ABSTRACT**

In recent years, the continuous use of chemical pesticides has led to the emergence of resistance in pests and environmental pollution. Hence, the need for the use of environmentally friendly and safe insecticides has become necessary. One of the most successful microbial agents in this field is *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt is a gram-positive, aerobic, soil-dwelling, spore-forming, that, following sporulation, forms crystal proteins encoded by *Cry* genes. For this purpose, in this study, 90 native isolates of Bt from soils of tobacco fields of Mazandaran and Golestan provinces were isolated and molecularly examined based on the *Cry* gene, a factor producing effective proteins against pests, based on the PCR method using seven pairs of specific primers for the *Cry I*, *Cry 1Ab*, *Cry 1Ac*, *Cry 1F*, *Cry 1I*, *Cry 2* and *Cry 9* genes. The results of bands obtained showed that the frequency of the genes in different isolates was very different, so that some genes such as *Cry 1Ab* had the highest frequency in the isolates studied, while the *Cry I* and *Cry 1I* genes had the lowest frequency. In some isolates, the genes were amplified in different sizes than expected. The results of this study can be useful for tracking native Bt isolates that have *Cry* genes effective on insects.

**Key words:** Molecular investigation, isolate, *Cry* genes, *Bacillus thuringiensis*, PCR

Researcher, Department of Biotechnology, Tirtash Tobacco Research and Education Center, Behshahr, Mazandaran, Iran

**Corresponding author:** noshinshazdeahmadi@yahoo.com