دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۱۲ ، شماره ۳، سال ۱۳۹۹، (۲۱۷-۲۰۱)

جداسازی سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک برخی از مهمترین مناطق استان فارس و ارزیابی اثر کشندگی آنها بر روی لارو حشره شب‌پره هندی

فاطمه توانگرزمین[۱] ، شهرام حسامی[۲]*، الهام معظمیان[۳] ، غلامرضا صالحی جوزانی[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
٤- استاد، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

باکتری (Bt) *Bacillu thuringiensis* پروتئین‌هایی بلوری تولید می‌کند که برای گونه‌های مختلف حشرات سمی می‌باشد. در این مطالعه سویه‌های Bt از خاک‌های برخی از نواحی استان فارس جداسازی و اثر کشندگی آنها روی حشره شب‌پره‌هندی (*Plodia interpunctella* Hubner) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ۱۱۰ جدایه باکتری از خاک مناطق شیراز، مرودشت، فسا و سروستان جداسازی شد. شناسایی اولیه جدایه‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم و بررسی بلور پروتئینی با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست صورت گرفت. جدایه ها از نظر شکل بلور پروتئینی کروی و لوزی بودند. بررسی مولکولی به روش PCR نشان داد که از ۱۱۰ جدایه جمع‌آوری شده، ٤۰ جدایه حاوی ژن Cry1 بودند. بررسی کشندگی آنها روی لارو سن سوم حشره شب‌پره هندی مطالعه گردید. بر طبق نتایج این پژوهش، غلظت 2×10^{8} $sporeml^{-1}$ بعد از گذشت ۷۲ ساعت، به‌عنوان مؤثرترین تیمار در نظر گرفته شد و سه جدایه sh20، g44 و FA-16 به‌ترتیب با درصد تلفات ۵۳/۳۳، ۸۰ و ۷۳/۳۳ بالاترین میزان مرگ و میر را روی لاروهای سن سوم حشره شب‌پره‌هندی ایجاد نمودند. جدایه‌های g46-29، g45-5، TA22، 35b و E8 روی لارو سن سوم حشره شب‌پره‌هندی بی‌تاثیر بودند. امید است که بتوان با معرفی این جدایه‌های بومی باکتری Bt، گامی مهم در راستای تولید داخلی سموم بیولوژیک برداشت.

واژه‌های کلیدی: حشره‌کش بیولوژیک، *Bacillus thuringiensis*، ژن Cry، جدایه بومی

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: he*sami@iaushiraz.ac.ir*

تاریخ دریافت مقاله:۹۹/٦/۵ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۸/۱۲

مقدمه

شب‌پره هندی (Hubner) *Plodia interpunctella* یکی از مهمترین آفات فرآورده‌های انباری در ایران و سراسر جهان محسوب می‌شود. این گونه همه‌جا زی طیف گسترده‌ای از محصولات از جمله غلات و حبوبات خام و فرآوری شده، خشکبار، میوه‌های خشک، خوراک دام و سیر را مورد حمله قرار می‌دهد (Johnson *et al.*, 1992; Marzban, 1997; Oluwafemi *et al.*, 2009). هنگامی‌که شرایط مطلوب باشد، این حشره می‌تواند به سرعت تکثیر شود. شب‌پره هندی، با دارا بودن تنوع میزبانی بالا، قدرت پراکنش و تولید مثل زیاد و خصوصیات ژنتیکی به خیلی از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده است (Mbata & Osuji, 1983; Phillips *et al.*, 2000).

استفاده بی قید و شرط و بیش از حد از حشره‌کش‌های شیمیایی برای حفاظت از محصولات کشاورزی در برابر آفات، تعادل طبیعی اکوسیستم‌های زراعی را بر هم می‌زند. بدین ترتیب، جمعیت انگل‌ها و شکارگرها کاهش یافته و در پی آن آفات ثانویه شیوع پیدا می‌کنند. همچنین این امر منجر به ایجاد مقاومت در آفات می‌شود. از طرفی به کار بردن بیش از حد آفت‌کش‌ها خطرات جدی برای سلامت کشاورزان و تبعات منفی بر روی محیط زیست و عملکرد گیاهان زراعی به همراه دارد (Gibbon D. 2011; Vimala Devi *et al.*, 2019).

اکثر آفت‌کش‌های شیمیایی حاوی مواد مضر و سمومی هستند که برای مدت طولانی در محیط باقی می‌مانند و نه تنها آفات غیرهدف بلکه بسیاری از حشرات و ارگانیسم‌های مفید اکوسیستم را نیز نابود می‌کنند (Georghiou, 1994). بنابراین، به دلیل هزینه‌های زیاد تولید و مخاطرات زیست‌محیطی، کنترل آفات تنها با استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی به مدت طولانی نمی‌تواند نتایج مطلوبی در بر داشته باشد. از این رو، تغییر روش‌های مبارزه‌ی رایج به مدیریت تلفیقی آفات[1] با محوریت مبارزه‌ی بیولوژیک، یک روش تکاملی و راهکار اساسی برای تثبیت جمعیت آفات زیر سطح زیان اقتصادی بدون ایجاد فشار انتخاب طبیعی بر روی افراد باقیمانده است (Sharma *et al.*, 2000). از بین عوامل میکروبی، باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) به عنوان موفق‌ترین عامل کنترل آفات در سراسر جهان معرفی شده به طوری که هم‌اکنون ۹۷ درصد از بازار جهانی آفت‌کش های بیولوژیک را به خود اختصاص داده است (Vimala Devi *et al.*, 2019).

Bt یک باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و اسپورزاست. تنها تفاوت قابل توجه فنوتیپی بین Bt با سایر گونه‌های *Bacillus*، تولید یک یا چند نوع از بلورهای پروتئینی دارای خواص حشره‌کشی است که به باکتری این توانایی را می‌دهد تا لارو حشرات راسته‌های مختلف نظیر پروانه‌ها، دوبالان وسخت‌بالپوشان را از پای درآورد و روی پستانداران و حشرات مفید غیر هدف بی‌اثر باشد (Roh *et al.*, 2007).

جدایه‌های Bt در زیست‌گاه‌های مختلفی مانند خاک، لاشه حشرات، بقایای گیاهی، آب‌های جاری و گرد و خاک انبارهای مواد غذایی یافت می‌شوند (Jara *et al.*, 2006). اما نمونه‌های خاکی فراوان‌ترین و متنوع‌ترین منبع Bt محسوب می‌شوند (Aramideh *et al.*, 2010). مارتین و تراورس[2] (1989) ۱۱۱۵ نمونه خاک از ۳۰ کشور مختلف از پنج قاره جهان را مورد بررسی قرار داده و ۸۹۱۶ جدایه Bt جداسازی کردند. ایشان همچنین گزارش نمودند که Bt در نمونه‌های قاره آسیا از بیشترین فراوانی برخوردار بوده است. در پژوهشی دیگر از ۵۳۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کره جنوبی، ۵۸ سویه Bt جداسازی گردید (Kim *et al*., 1998). در تونس، در میان ۷۴ سویه باسیلوس جدا شده از خاک‌های مختلف، ۲۰ سویه Bt جداسازی شد (Cherif *et al*., 2001).

[1]. Integrated pest management, IPM
[1]. Martin and Travers

در ایران، مرزبان و همکاران (۱۳۸۱) از ۷٦ نمونه خاک زراعی شهرستان کرمانشاه یک جدایه Bt و فروزان و همکاران (۱۳۹۰) از ٦۰ نمونه خاک مربوط به باغ‌های انگور شهرستان سلماس ۲۵ جدایه Bt جداسازی نمودند. صالحی جوزدانی و همکاران (2008) ۲۲۹۲ نمونه خاک زراعی از سراسر ایران را جمع‌اوری نموده و ۱۲۸ جدایه Bt جداسازی کردند. خرم‌نژاد و همکاران (۱۳۹٤) ضمن بررسی ۱٤۸ نمونه خاک از جنگل، باغ و مزرعه و دو نمونه لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی از استان های گیلان، مازندران، آذربایجان غربی و البرز، ۱۰ سویه Bt جداسازی نمودند. گرایلی مرادی و همکاران (۱۳۹۳) ۱٦۰ نمونه از خاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اکولوژیکی استان مازندران شامل خاک‌های مناطق جنگلی، باغی، شهری، زراعی و بدون پوشش بررسی کرده و ٦۳۵ جدایه به دست آوردند. از این میان ۱٦۰ باکتری دارای کلاهک، اسپورزا و تولیدکننده کریستال بودند.

شناسایی سویه‌های بومی با پتانسیل حشره‌کشی بالا و همچنین با دامنه میزبانی جدید می‌تواند به کنترل میکروبی حشره‌های آفت و کاهش ظهور مقاومت در آن‌ها کمک شایانی نماید. در این راستا، پژوهش حاضر با هدف جداسازی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک زیست‌بوم‌های مختلف استان فارس و ارزیابی قدرت بیماری-زایی آنها بر روی حشره شب‌پره هندی صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری Bt از خاک

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از چهار منطقه مختلف استان فارس شامل شهرستان‌های شیراز، سروستان، مرودشت و فسا انجام گرفت و در مجموع ۵۰ نمونه خاک از شش کاربری مختلف (خاک بدون پوشش، باغی، شهری، جنگلی، زراعی و بستر دریاچه نمک) جمع‌آوری شد. جداسازی ایزوله‌ها بر اساس روش بهبود یافته سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت (Sanata *et al.*, 2008). به منظور تأیید جدایه‌های مورد نظر، از رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی توکسین و شناسایی ژنوتیپی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید (Soleimany *et al.*, 2018).

رنگ آمیزی توکسین بلوری

پس از کشت باکتری در محیط نوترینت آگار در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و ورود به مرحله اسپورزایی، توکسین بلوری رنگ آمیزی شد. در این مرحله نمونه باکتری روی لام شیشه‌ای تثبیت و و رنگ آمیزی با محلول حاوی رنگ ۰/۱۳۳ درصد بریلینت آبی حل شده در استیک اسید ۵۰ درصد انجام شد. توکسین بلوری پس از مرحله شستشو با آب مقطر با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکولی باکتری Bt

به منظور استخراج DNA از کیت ویژه استخراج DNA ژنوم باکتریایی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (یکتا طب تجهیز، ایران) استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم ۲۵ میکرولیتر، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵/۲ میکرو لیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (سیناژن، ایران) ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (سیناژن، ایران) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن، ایران) با غلظت میکروگرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر (جدول ۱)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم پلیمراز (سیناژن، ایران)

و یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر مخلوط شدند. برای آغاز فرایند پلیمریزاسیون در این روش، ترمیم سیکلر بیوراد[3]، به مدت یک دقیقه روی دمای ۹٤ درجه سلسیوس تنظیم شد. سپس، ۳۵ چرخه PCR به شکل ۹٤ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای یک دقیقه اجرا و عمل طویل‌سازی نهایی به مدت ٤ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. برای اطمینان از تکثیر ژن 16S rDNA، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی بافر TBE 1X به مدت ٦۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ ولت انجام و از دستگاه UV ترانس لومیناتور برای مشاهده نتایج ژل استفاده شد (Rampersad & Ammons, 2005; Soleimany *et al.*, 2018). در پایان محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار بلاست[4] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تعیین ویژگی‌های جدایه‌ها

رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز[5]، آزمون همولیزین[6]، تجزیه نشاسته، سیترات، اوره‌آز و تخمیر قندها برای تمامی جدایه‌ها انجام شد. همچنین، مؤثرترین جدایه‌های Bt (بر اساس نتایج زیست‌سنجی) با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی اسکولین[7]، سالیسین[8]، لسیتیناز[9]، سوکروز[10] بیوتیپ‌بندی شدند (Martin & Travers, 1989).

جدول ۱- ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن Cry1 در باکتری *Bacillus thuringiensis*

Table 1- Characteristics of primers for amplification of cry1 gene in *Bacillus thuringiensis*

Gene	Primers	Sequence (5' to 3')	PCR Product Length
Cry1	F R	CATGATTCATGCGGCAGATAAAC TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT	277bp

زیست‌سنجی جدایه‌ها

حشره و لارو شب‌پره هندی از بخش حشره‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز تهیه شد. لاروها روی مواد غذایی شامل گردو، بادام، پسته، خرما، انجیر خشک، توت، جیره غذایی پرورش داده شدند. حشرات کامل و لاروها به مدت یک نسل در اتاقک رشد با دوره نوری ۱٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ٦۰ درصد پرورش داده شدند. جهت به دست آوردن لاروهای هم سن، تخم‌های جمع‌آوری شده در یک روز، درون یک ظرف جداگانه نگهداری شده و پس از گذشت ۱۰ روز از تغذیه لاروها، از آنها به عنوان لاروهای سن سوم جهت انجام آزمایش استفاده شد (Momenzadeh *et al.*, 2014).

جهت ارزیابی اثر کشندگی جدایه‌ها، ۱/۵ گرم از غذای حشرات با سوسپانسیون باکتری (غلظت 10^{2} sporeml^{-1}) آغشته شد. هر تیمار شامل سه تکرار بود و در هر تکرار ۵ عدد لارو سن سوم به کار گرفته شد. تعداد تلفات لاروی

[3] . BioRAD
[4] . BLAST
[5]. Catalase
[6]. Hemolysin
[6]. Esculin
[7]. Salicin
[8]. Lecithinase
[9]. Sucrose

طی ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. معیار مرگ و میر در اثر باکتری، سیاه شدن و عدم واکنش به ضربه سوزن بود (Momenzadeh *et al.*, 2014). همچنین، اثر کشندگی جدایه‌های مؤثر (جدایه باکتری حاوی Cry1 با بالاترین درصد مرگ و میر روی لاروهای شب پره هندی) با غلظت‌های ۲×۱۰^{۶}، ۳×۱۰^{۶}، $۶/۳\times۱۰^{۶}$، ۲×۱۰^{۸} و ۲×۱۰^{۹} اسپور بر میلی‌لیتر بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (۱۵ لارو برای هر تکرار) صورت پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۱ درصد و به وسیله نرم‌افزار SAS انجام گرفت. مقادیر LC_{50} به روش تجزیه پروبیت (Finney, 1952) و با استفاده از نرم‌افزار polo-plus تعیین گردید.

نتایج

شناسایی به‌وسیله رنگ آمیزی توکسین

بعد از کشت باکتری‌ها روی محیط کشت آگار در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رنگ آمیزی به روش کوماسی برلیانت، ۱۱۰ جدایه Bt شناسایی شده و بر اساس شکل بلور پروتئین در دو گروه کروی و لوزی قرار گرفتند.

تعیین ویژگی‌های جدایه‌ها

پس از رنگ‌آمیزی گرم، همه جدایه‌ها به رنگ بنفش درآمدند که این یکی از ویژگی باکتری Bt (گرم مثبت) می‌باشد. در تمام موارد سویه‌های جداشده در تولید کاتالاز و همولایزین توانایی بارزی داشتند و همه مثبت بودند. سویه های جداسازی شده از نظر حرکت متغیر بودند. اما تمامی سویه‌ها از نظر تولید هیدرولیز اسکولین و نشاسته مثبت و تست اوره آز منفی را داشتند. اکثر سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز، فروکتوز را داشته وتولید اسید می‌نمودند. هیچ یک از سویه‌های جداسازی شده توانایی تخمیر مانیتول و استفاده از سیترات را نداشتند.

سه جدایه Bt جداسازی شده از شیراز و فسا شامل sh20، g44 و FA-16 که دارای بالاترین درصد مرگ و میر روی لارو سن سوم حشره شب‌پره هندی بودند، بر اساس چهار آزمون تخمیری بیوتیپ‌بندی شدند که ایزوله g44 و sh20متعلق به بیوتیپ *Thuringiensis* و ایزوله FA-16 متعلق به بیوتیپ Kurstaki بودند (جدول ۲).

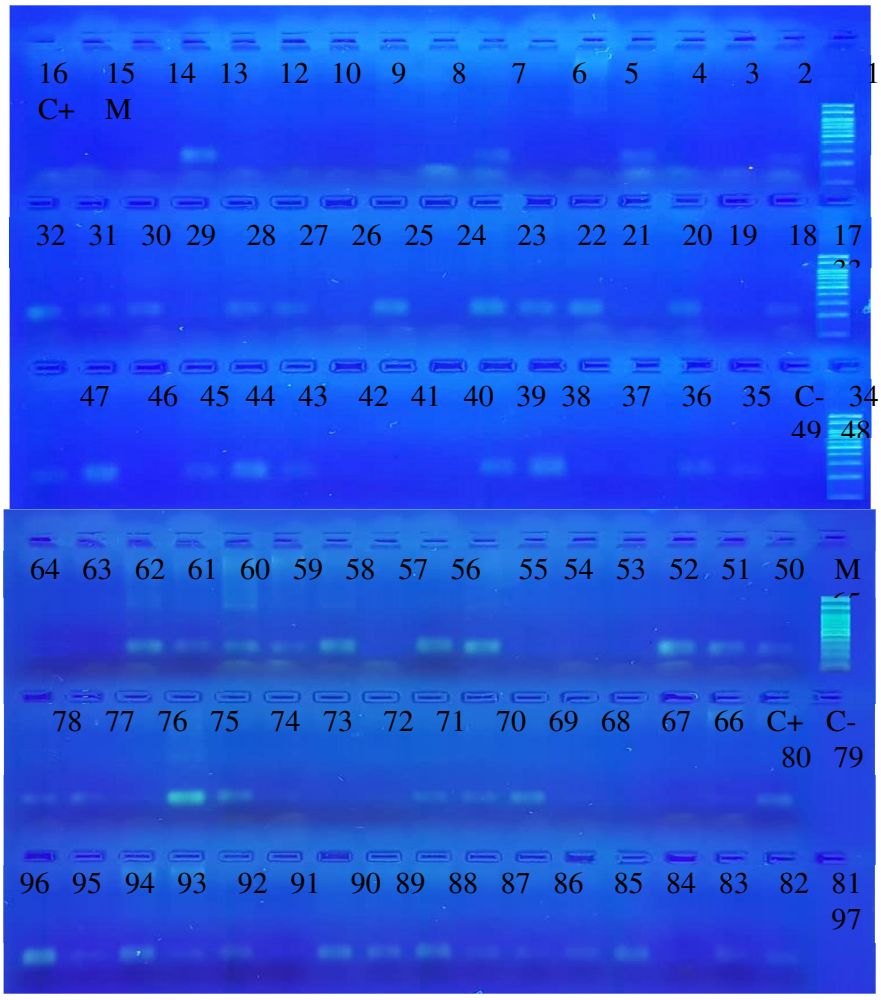
جدول ۲- بیوتیپ‌بندی ایزوله‌های *Bacillus thuringiensis*

Table 2. Biochemical types of *Bacillus thuringiensis*

Strain	Biochemical type	Esculin	Salicin	Lecithinase	Sucrose
g44	*Thuringiensis*	+	+	+	+
sh20	*Thuringiensis*	+	+	+	+
FA-16	*Kurstaki*	+	+	+	–

شناسایی باکتری به روش مولکولی

نتایج مطالعات مولکولی نشان داد که از ۱۱۰ جدایه باکتری Bt جداشده از خاک، ٤۰ جدایه حاوی ژن Cry1 بودند (شکل ۱ و ۲). در تمام مراحل کار از سویه استاندارد باکتری Bt با کد NCIMB9134 تهیه شده از بخش میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، به عنوان شاهد استفاده شد.



شکل ۱- نتایج محصولات PCR برای ردیابی ژن Cry1 بر روی DNA باکتری *Bacillus thuringiensis* (M: شاخص مولکولی ۵۰ جفت بازی، ۱ تا ۹۷: جدایه های بومی، +C: نمونه کنترل مثبت و -C: نمونه کنترل منفی).

Fig 1- Results of PCR products to detect Cry1 gene on DNA of *Bacillus thuringiensis* (M: 50 bp molecular marker, 50 to 97: native isolates, C+: positive control sample and C-: negative control sample).

تاثیرکشندگی جدایه‌های Bt برروی لارو سن سوم شب‌پره هندی

به منظور بررسی اثرات حشره‌کشی جدایه‌های مورد بررسی، درصد مرگ و میر لارو سن سوم حشره شب‌پره هندی برای ٤١ جدایه باکتری با غلظت 10^{2} $Sporeml^{-1}$ محاسبه شد (جدول ٣). به طور کلی نتایج نشان داد با توجه به درصد مرگ و میر روی لارو سن سوم شب‌پره هندی بعد از گذشت ٤٨ و ٧٢ ساعت، در ٤١ جدایه Bt، زمان در میزان آنالیز داده‌ها مؤثر است، به طوری که بین تلفات حاصل از جدایه‌ها بعد از گذشت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت اختلاف معنی داری وجود دارد. با گذشت زمان میزان تلفات بیشتر شد و بالاترین میزان مرگ و میر در ٤١ جدایه، در ٧٢ ساعت ثبت شد. نتایج نشان داد که سه جدایه شامل FA-16، g44 و sh20 در ٧٢ ساعت به ترتیب با درصد تلفات ٥٣/٣٣، ٨٠، ٧٣/٣٣ بالاترین میزان مرگ و میر لاروهای سن سوم شب‌پره‌هندی را نشان داد. جدایه‌های g46-29، g45-5، TA22، E8 و 35b روی لارو سن سوم حشره شب‌پره‌هندی بی تأثیر بودند (جدول ٣).

زیست‌سنجی مؤثرترین جدایه‌ها روی لارو شب‌پره هندی

زیست‌سنجی سه جدایه FA-16، g44 وsh20 با بالاترین درصد مرگ و میر درمحیط کشت NB در ۵ غلظت (غلظت ۲×۱۰^{۹}، ۲×۱۰^{۸}، $۶/۳\times۱۰^{۶}$، ۳×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶}) بررسی شد (جدول ٤ و ٥). نتایج حاصل از از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در ٢٤ ساعت اول، ٤١ جدایه به لحاظ درصد مرگ و میر اختلاف معناداری نداشتند، اما بین میانگین درصد مرگ و میر جدایه‌ها بعد از ٤٨ ساعت در سطح آماری ٥ درصد و بعد از ٧٢ ساعت در سطح آماری یک درصد، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ٦).

جدول ۳-میانگین درصد (±SE) تلفات ایجاد شده با غلظت $۱۰^{۲}$ Spore ml^{-1} از سویه‌های باکتری Bt روی لارو سن سوم شب پره هندی در زمان‌های مختلف

Table 4- Mean percentage (± SE) of mortality caused by 10^{2} Spore ml^{-1} concentration of Bt strains on the third instar larvae of Indian meal moth at different times

ردیف	نام سویه ها	۲٤ ساعت	٤٨ ساعت	۷۲ ساعت
1	gohy	۰۰/۰۰g ± ۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳
2	goho	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰ g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦
3	gho1-13	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۲۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳
4	g41	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤fg ±۱۳/۳۳	۰۰/۰۰bcd ±٤۰/۰۰
5	g34-7	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۲۳/۰۹b ±٥۳/۳۳
6	ga24	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤fg ±۱۳/۳۳	۲۳/۰۹b ±٥۳/۳۳
7	g19	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤g ±٦/٦٦	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦
8	g12-6	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰	۰۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰
9	g38-1	۰۰/۰۰g±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤g ±٦/٦٦	۲۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰
10	g45-5	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰
11	g46-29	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰
12	g30	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳
13	g44	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ cde ±۳۳/۳۳	۰۰/۰۰a± ۸۰/۰۰
14	goh1-10	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۲۳/۰۹ def ±۲٦/٦٦	۲۳/۰۹def ±۲٦/٦٦
15	55b	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦
16	195b	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۲۳/۰۹def ±۲٦/٦٦
17	g35	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦
18	sh33	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰
19	sh20	۱۱/٥٤fg ± ۱۳/۳۳	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳	۱۱/٥٤a ±۷۳/۳۳
20	sh25-20	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ def ±۲٦/٦٦	۲۳/۰۹def ±۲٦/٦٦
21	sh34	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦
22	sh19	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤b ±٥۳/۳۳
23	s1	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤fg ±۱۳/۳۳	۱۱/٥٤g ±٦/٦٦
24	F2	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳
25	N3-2	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۲۳/۰۹def ±۲٦/٦٦
26	Na	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤g ±٦/٦٦	۱۱/٥٤g ±٦/٦٦
27	BT	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦	۱۱/٥٤cde ±۳۳/۳۳
28	E8	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰
29	E4	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/٥٤ fg ±۱۳/۳۳	۱۱/٥٤def ±۲٦/٦٦

30	B1	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤b ±۵۳/۳۳
31	TA22	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤def ±۲٦/٦٦	۱۱/۵٤b ±۵۳/۳۳
32	B7	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤fg ±۱۳/۳۳	۱۱/۵٤bc ±٤٦/٦٦
33	FA1-13	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤b ±۵۳/۳۳
34	35b	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰
35	rf2	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤def ±۲٦/٦٦
36	125b	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤g ±۰۰/۰۰
37	FA-16	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤cde ±۳۳/۳۳	۱۱/۵٤b ±۵۳/۳۳
38	PTCC	۱۱/۵٤ g ±٦/٦٦	۱۱/۵٤cde ±۳۳/۳۳	۱۱/۵٤g ±۵۳/۳۳
39	12N	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤def ±۲٦/٦٦	۱۱/۵٤def ±۲٦/٦٦
40	Sh17	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۱۱/۵٤fg ±۱۳/۳۳	۰۰/۰۰efg ±۲۰/۰۰
41	KLa3	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰	۰۰/۰۰g ±۰۰/۰۰

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند با هم اختلاف معنی‌دار ندارند (LSD, P=0.01).

جدول ٤- میانگین درصد (±SE) تلفات ایجاد شده با پنج غلظت مختلف از جدایه های مؤثر بر روی لارو سن سوم شب‌پره هندی

Table 5- Mean percentage (± SE) of mortality caused by five different concentrations of the effective strains on the third instar larvae of Indian meal moth

غلظت	بعد از ٤٨ساعت			بعد از ۷۲ ساعت		
	FA-16	**g44**	**sh20**	**FA-16**	**g44**	**sh20**
۲×۱۰^{۹}	۱۵.۵۵±۳.۸٤ abc	۲۰±۳.۸٤ ab	۱۵.۵۵±۱۳.۸۷ abc	۲۲.۲۲±۱۰.۱۸ ef	۳۱.۱۱±۳.۸٤ cde	٤٤.٤٤±۱٦.۷۷ abc
۲×۱۰^{۸}	۱۷.۷۷±۳.۸٤ abc	۲۲.۲۲±٦.٦٦ a	۱۷.۷۷±۳.۸٤ abc	۳۱.۱۱±۳.۸٤ cde	۳۷.۷۷±۳.۸٤ bcd	۵۵.۵۵±۳.۸٤ a
$٦/۳\times۱۰^{٦}$	۱۱.۱۱±۳.۸٤ abc	۱۷.۷۷±۳.۸٤ abc	۱۳.۳۳±٦.٦٦ abc	۱۷.۷۷±۳.۸٤ efg	۲٦.٦٦±۰ def	۵۱.۱۱±۱۰.۱۸ a
۳×۱۰^{٦}	۸.۸۸±۳.۸٤ bc	۱۷.۷۷±۱۰.۱۸ abc	۱۳.۳۳±۰ abc	۱۵.۵۵±۳.۸٤ efg	۲۲.۲۲±۳.۸٤ ef	٤٤.٤٤±۱۳.۸۷ abc
۲×۱۰^{٦}	٦.٦۷±۰ c	۱۵.۵۵±۳.۸٤ abc	۱۱.۱۱±۳.۸٤ abc	۱۷.۷۷±۳.۸٤ fg	۲۰±۰ efg	۱۱.۵٤±٦.٦٦ g

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* روی لاروهای سن سوم شب‌پره هندی

Table 6- Analysis of variance for the effect of different concentrations of *Bacillus thuringiensis* on third instar larvae of Indian moth

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه ها (A)	٤۰	۷۸۰/۸٦**
زمان (B)	۲	۲۸۷۳٦/۰٤**
A× B	۸۰	٤۵۸/۲٦**
خطای آزمایش	۲٤٦	۹۲/۱٤
ضریب تغییرات	-	۲۱/۰٦

**** معنی‌داری در سطح ۱ درصد**

جدول ٦-تجزیه واریانس اثر غلظت های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* روی لارو های سن سوم شب‌پره‌هندی در زمان‌های مختلف

Table 7- Analysis of variance for the effect of different concentrations of *Bacillus thuringiensis* on third instar larvae of Indian moth in different times

منابع تغییر	درجه آزادی	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت	٧٢ ساعت
سویه ها (A)	٢	٠/٩٨٧^{ns}	١٧٢/٨٣*	١٤٨٢/٤٦**
غلظت های مختلف (B)	٤	٠/٩٨٧^{ns}	٨٧/٤٠*	١٨٠/٢٤*
A× B	٨	٠/٩٨٧*	٧/٤٠*	٦١٢/٠٩**
خطای آزمایش	٣٠	٠/٩٨٧	٣٧/٥٣	٦٢/٢٢
ضریب تغییرات	-	١٠/٨٢	٢٠/٩٤	٢٦/٦٢

ns و * به ترتیب تفاوت غیر معنی‌دار وتفاوت معنی‌داری درسطح ٥ درصد

مقادیر LC_{50} سه جدایه FA-16، g44 و sh20 باکتری Bt روی لارو سن سوم شب‌پره‌هندی

مقدار LC_{50} جدایه g44 در زمان ٤٨ و ٧٢ ساعت به ترتیب برابر با، ٤٣٤/٨٣ spore ml^{-1}، ٣٢٠/٦٩ sporeml^{-1} محاسبه شد. LC_{50} برای جدایه sh20 در زمان ٤٨ و ٧٢ ساعت به ترتیب برابر با ٧١١/٧٢ spore ml^{-1}، ٤٦٣/٧١ spore ml^{-1} و برای جدایه FA-16 در زمان ٤٨ صفر و در زمان ٧٢ ساعت برابر با ٦٩٤/٧٨ spore ml^{-1} به دست آمد (جدول ٧).

جدول ٧-مقادیر LC_{50} برای جدایه‌های مؤثر *Bacillus thuringiensis* روی لارو سن سوم شب‌پره هندی در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از کاربرد

Table 8- Average lethal concentration (LC50) of *Bacillus thuringiensis* isolates on third instar larvae of Indian moth, 48 h and 72 h after the application of the bacteria

	زمان	درجه آزادی	χ^2	b ± SE	LC_{50}	احتمال	حد پایین	حد بالا
sh20	٤٨ ساعت	٢	٢١/٢١	٠/٥٣±٠/٠٥٧	٧١١/٧٢	٣/٠٠	٥٤١/٢٤	١٠٠٢/٨٧
	٧٢ ساعت	٢	١٨/٥٦	٠./٥٣± ./٦٨	٤٦٣/٧١	٢/٤٢	٢٧١/٠٧	٦٣٨/٨٨
FA-16	٤٨ ساعت	٢	٨/٦٦	٠./٦٠± ./٢٨	٠	٠/٦٩	٨٩٦/٠١	٥٥٤٦/١٢
	٧٢ ساعت	٢	٧/١٦	./٥١± ./٤٥	٦٩٤/٧٨	١/٥٩	٥١١/٨٧	١٠٠١/٩٠
g44	٤٨ ساعت	٢	١٥/٣٢	٢/١٠± ./٩٢	٤٣٤/٨٣	٣/٨٣	٣٥٢/٤١	٥١٥/٠٤
	٧٢ ساعت	٢	١٠/٧١	٠./٧٤±./٩	٣٢٠/٦٩	٤/٨٩	٢٥٦/٤١	٣٨١/٧١

فاصله اطمینان ٩٥ درصد

بحث

زیستگاه باکتری

در پژوهش حاضر از خاک‌های اکوسیستم‌های مختلف در برخی از مهمترین شهرستان‌های استان فارس شامل شیراز، فسا، سروستان و مرودشت، ١١٠ جدایه Bt جداسازی شد، که نشان دهنده فراوانی قابل توجه آن در نمونه‌های خاکی است. بر اساس پژوهش‌های انجام شده، یکی از مکان‌های مهم جداسازی این باکتری نمونه‌های خاکی است (Khetan, 2001). پژوهش حاضر مؤید این امر است که این باکتری را می‌توان از خاک‌های مناطق استان فارس استخراج نموده و مورد بررسی قرار داد.

شکل‌شناسی بلور پروتئینی باکتری Bt

در این پژوهش، شناسایی باکتری بر اساس تولید سم و بررسی الگوی پروتئینی انجام گردید. بعد از کشت، جدایه‌ها به لحاظ شکل ظاهری کلنی، مات و تخم مرغی شکل بودند. بعد از رنگ آمیزی و مشاهده بلور پروتئینی، جدایه‌ها بر اساس شکل بلور به دو دسته کروی و لوزی شکل طبقه‌بندی شدند. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt توسط تراورس و همکاران (1987) انجام شد که نشان داد ۲۰ تا ۹۶ درصد از گونه های Bt که به‌صورت تصادفی از محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده کریستال بودند.

چریف[11] و همکاران (2001) در میان ۷٤ سویه Bt جداشده از خاک های مختلف در تونس، ۲۰ سویه و اجیفور و جینسون[12] (2002) از ٤۱۳ نمونه خاک، ۲۵ نمونه Bt به دست آوردند که (۳۲/٦ درصد) در میان آن‌ها کریستال تولید کردند. بنابراین پژوهش‌ها نشان می‌دهد که جستجو برای یافتن این باکتری با دستاوردهای متغیری همراه بوده است. اغلب مطالعات، بیانگر فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی است.

اپایدین[13] (2005) در ترکیه در بررسی شکل بلور جدایه‌های این باکتری نتیجه گرفتند که اکثر جدایه‌ها (۳٦ درصد) دارای بلورهای پروتئینی کروی بوده وتنها ۲ درصد آن‌ها بلور پروتئینی دوهرمی داشتند. حدود ٤۰ درصد از سویه های جداسازی شده در پژوهش حاضر کریستال تولید کردند. در تحقیقات انجام شده در ژاپن مشخص شد که بیشتر جدایه‌ها (۵۳ درصد) دارای بلور پروتئین کروی، ٤۲/٤ درصد دارای بلور پروتئینی نامنظم و۳ درصد دارای بلور پروتئینی دوهرمی بودند (Yasutake *et al*., 2007). در پژوهش حاضر بلور پروتئینی دوهرمی یافت نشد. در تحقیق دیگر مشخص شد که ٤۷ درصد جدایه‌ها دارای بلورهای پروتئینی نامنظم بوده و تنها ۳ درصد آنها دارای بلور پروتئینی کروی بودند (Arrieta & Espinoza, 2006). همچنین آرمنگل[14] (2007) شکل بلورهای ٤٤۵ جدایه باکتری Bt به دست آمده از مناطق طبیعی کلمبیا را بررسی کردند و دریافتند که فراوان‌ترین نوع بلور دوهرمی است، که با نتایج ما مغایرت دارد. تفاوت در توزیع شکل بلور پروتئینی ممکن است به علت تنوع ژنتیکی جدایه‌ها باشد که آن نیز احتمالا به دلیل تفاوت در شرایط زیست محیطی یا تاثیرات زیستگاه می‌باشد (Al-Momani *et al*., 2004).

آرمیده و همکاران (2010) در بررسی جدایه‌های این باکتری که از مناطق مختلف آذربایجان غربی جمع‌آوری کرده بودند، دریافتند که بیشترین نوع بلورها متعلق به فرم‌های کروی بود. معظمیان و همکاران(۱۳۸۹) از بین ٦۹٦ جدایه شبیه به Bt، ۱٤٦ جدایه را از نظر حضور بلور پروتئین مورد مطالعه قرار دادند .از بین کلنی‌های انتخابی، ۵۰ نمونه دارای بلور بودند و اجسام پاراسپورال در دو دسته لوزی شکل (بزرگ تر از اسپور) و کروی شکل (کوچک تر از اسپور) قرار گرفتند.

ردیابی مولکولی ژن Cry1

در پژوهش حاضر، از ۱۱۰ جدایه باکتری Bt جداشده از خاک، ٤۰ جدایه حاوی ژن Cry1 بودند. تحقیقات نشان می‌دهد که Bt در خاک کشورهای مختلف دارای ظرفیت‌های متفاوت ژنتیکی در کد کردن توکسین می‌باشند. این امر می‌تواند در نتیجه شرایط جغرافیایی مختلف و تنوع خاک و اقلیم باشد. توحیدی و همکاران (۱۳۹۰) با مطالعه خاک‌های غرب مازندران (تنکابن) نشان دادند که پس از استخراج DNA از تمامی سویه‌ها با استفاده از روش 16S rDNA Sequencing و روش‌های انتخابی، سویه‌های حاوی ژن Cry1 شناسایی شدند. به این ترتیب، از میان ۱۲ سویه جدا شده

[11] Cherif
[12] Ejifor and Jihnson
[13] Apaydin
[14] Armengol

تنها در یک سویه ژن Cry1 به روش مولکولی شناسایی گردید. محمودی (2017) ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف تهران را بررسی و ٤١ جدایه Bt به دست آورد. وی با روش مولکولی PCR نشان داد کـه ٤٠ درصـد از سـویه‌هـا حـاوی ژن Cry1هستند.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، بیشترین تعداد سویه‌های تولید کننده کریستال از خاک‌های منـاطق بـاغی و جنگلـی و کمترین تعداد از خاک‌های نواحی بدون پوشش جداسازی شد. گرایلی مرادی و همکاران (۱۳۹۳) تنوع بـاکتری Bt را در اکوسیستم‌های مختلف استان مازندران بررسی کردند. آنها از ١٦٠ نمونه از خاک‌های مناطق جنگلی، باغی، شهری، زراعی و بدون پوشش، ٦٣٥ جدایه به دست آوردند که از این بین، ١٦٠ باکتری، تولید کننده اسپور و کریستال بوده است. نتـایج آنها نشان داد که بیشترین سویه‌های تولید کننده کریستال در اکوسیستم جنگل با ۳۲/٦۳ درصد بوده و بنابراین خـاک‌هـای نواحی جنگلی منبع مناسبی برای یافتن سویه‌های مؤثر باکتری Bt است. این بررسی نشان داد که اگرچه Bt تنها در صورت وارد شدن به چرخه زیستی حشرات، مؤثر واقع می‌شود، اما به خوبی در خاک های مناطق مختلف پراکنـده شـده و قابـل ردیابی است.

اثر کشندگی جدایه‌های Bt بر روی لارو شب‌پره هندی

بر طبق نتایج آزمون کشندگی جدایه‌ها، مقدار غلظت کشـنده ٥٠ درصـد (LC_{50}) بـرای جدایـه بـاکتری sh20 بعـد از گذشت ٤٨ و ٧٢ ساعت برابر با ٧١١/٧٢ و ٤٦٣/٧١ و مقدار LC_{50} برای جدایه g44 بعد از گذشت ٤٨ و ٧٢ ساعت برابر است با ٤٣٤/٨٣ و ٣٢٠/٦٩ و مقدار LC_{50} برای جدایه FA-16 بعد از گذشت ٧٢ ساعت برابر با ٦٩٤/٧٨ می‌باشد. بسیاری از زیرگونه‌های باکتری Bt شـامل زیرگونـه‌هـای *kurstaki*، *aizawai*، *entomocidus*، *thuringiensis*، *kenvae*، *galleriae*، *candensis*، *tolvorthi*، *darmstadiensis*، *aegypti* و *wushansis* روی سـنین مختلـف لاروی شـب‌پـره هنـدی خاصـیت کشندگی دارند (Romeilah & Abde-megged, 2000). سالاما[15] و همکاران (1989) مقدار LC_{50} جدایه‌هـای HD-133 و HD-635باکتری Bt روی لارو سن سوم کرم برگخوار پنبه پس از ۷ روز را به ترتیب ۱۵۰ و ۹۵ میکروگـرم بیـان کردنـد. سیلوا[16] و همکاران (2004) مقدار LC_{50} جدایه S701 باکتری Bt برای کنترل لاروهای سن دوم حشره شـب‌پـره برگخـوار پاییزی را $٦/٥\times١٠^{-٧}$ (بر حسب رقت) محاسبه کردند. علت اختلاف در نتایج را می توان به تفاوت در روش آزمایش، نوع جدایه‌ها و بیان ژن‌های Cry نسبت داد. معقولی‌فرد و همکاران (2020) عنوان نمودند که مقدار LC_{50} یک جدایه Bt بـومی ایران (GON-9) روی لاروهای ٥ روزه پروانه برگخوار مصری پنبه برابر با $٢/٧٨\times١٠^{-٧}$ اسپور در میلی‌لیتر می‌باشد. ایشـان همچنین بیان داشتند که کاربرد توأمان Bt و نوکلئوپلی ویروس، می‌تواند کارایی و بازدهی اقتصادی کنترل پروانه برگخوار مصری را افزایش دهد.

آرمیده و همکاران (2010) در پژوهش خود به این نتیجه دست یافتند که بعد از گذشـت ۷۲ سـاعت، ٤١/٦٦ درصـد جدایه‌ها روی حشرات بید آرد تلفات ۷۰-٥٠ درصد و روی لاروهای این حشره تلفـات بـین ۱۰۰-۷٥ درصـد را باعـث می‌شوند. در پژوهش انجام شده توسط هونگیو[17] و همکاران (2000) در چین نیز بعد از گذشـت ۷۲ سـاعت، ٥٨ درصـد جدایه‌ها نسبت به لاروهای شب پره هندی تلفات بالای ٦٠ درصد نشان دادند. طبق نتـایج پـژوهش حاضـر، از بـین سـه جدایه FA1-16، g44 و sh20، جدایه g44 روی لاروهای شب‌پره‌هندی باعث مرگ ومیر لاروی بیشتری شـدند، در حـالی که برخی جدایه‌ها شامل g12-6، g38-1، g41، s1 و gho1-13 روی لاروهای شب‌پره هندی تاثیر کمـی داشـتند. گـاهی

[15] Salama
[16] Silva
[17] Hongyu

ممکن است جدایه‌های مختلف باکتری Bt حتی در یک گونه در میزان بیماری‌زایی برای یک حشره خاص متفاوت باشد که می‌توان آن را به توکسین‌های مختلف تولید شده توسط استرین‌ها نسبت داد. بنابراین می‌توان گفت که باکتری‌ها بسته به محیط کشت و میزبان‌های مختلف، عملکردهای مختلفی دارند که احتمالاً مربوط به بیان ژن‌های مؤثر باکتری Cry برای هر آفت می‌باشد. گاهی ممکن است یک جدایه حاوی ژن کشنده باکتری برای یک نوع آفت باشد ولی در محیط کشت مورد استفاده، آن ژن بیان نشود. بیان ژن‌های کریستال‌های سمی روی ژنوم باکتری Bt بسته به محیط کشت باکتری و حتی بسته به عواملی نظیر سن لارو، شرایط رشد لارو، نوع آفت وحتی سن لاروهایی که از غذای آلوده به باکتری تغذیه می‌کنند، متفاوت بوده و ممکن است ژن مربوطه بیان نشوند (Dutton *et al*., 2003). گاهی ممکن است ژن مربوطه بیان شود و کریستال‌های پروتئینی ساخته شوند ولی به دلیل کاهش اتصال توکسین به گیرنده‌های موجود در روده میانی، کاهش حلالیت پروتوکسین، انجام فرایندهای پروتئولیتیک و تخریب و رسوب توکسین توسط پروتئازها، حشره نسبت به Bt مقاومت نشان دهد (Bruce *et al*., 2007). بنابراین، یافتن جدایه‌های مؤثرتر علیه شب‌پره هندی، انتخاب محیط کشت با عملکرد بهتر، مبارزه با لاروهای آفت در سنین پایین‌تر و ترکیب کردن باکتری‌ها با دیگر عوامل کشنده برای کاهش مقاومت به باکتری و کاهش صدمات حاصل از تغذیه لاروها اهمیت دارد. شب‌پره هندی و بقیه بالپولکداران در لاروهای سن دوم و سوم دارای حساسیت بالایی نسبت به توکسین‌های خاص خود دارند، در حالی که از سن چهارم لاروی به بعد، به دلیل فعالیت‌های بالای پروتئولیتیک که منجر به تخریب کامل توکسین می‌شوند، مقاومت نشان می‌دهند (Bae *et al*., 1993; Keller *et al*., 1996).

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، زمان در کشندگی حشرات اثر معنی‌دار دارد. همان طور که انتظار می‌رفت با گذشت زمان، میزان مرگ و میر مشاهده شده در لارو سن سوم حشره شب‌پره هندی ناشی از حشره‌کش میکروبی Bt بیشتر شد؛ طوری که در آخرین نمونه‌برداری بیشترین درصد کشندگی در تیمار Bt با غلظت ۲×۱۰^{۸} در ۷۲ ساعت ثبت شد. کمترین اثر کشندگی در غلظت ۲×۱۰^{۶} مشاهده شد که نشان می‌دهد با افزایش غلظت میزان مرگ و میر افزایش یافته است. دماوندیان و همکاران (۱۳۹۵) ضمن تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ۳ نوبت نمونه‌برداری در ارزیابی آزمایشگاهی Bt روی یک کرم جوانه‌خوار از دوبالان، نشان دادند که در نمونه‌برداری‌های ۳ روز پس از تیمار، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود داشت. تیمار Bt با غلظت نیم درصد پس از یک روز با شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد لاروهای زنده نداشت. در صورتی که تیمار Bt با غلظت یک درصد کمترین تعداد لاروهای زنده را داشته که حاکی از تأثیر بیشتر این تیمار بوده است. در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ روز پس از تیمار، تعداد لاروهای زنده در نمونه شاهد نسبت به سه تیمار دیگر از لحاظ آماری بالاتر بود. سه روز پس از تیمار، تعداد لاروهای زنده در تیمار Bt با غلظت یک درصد به طور معنی‌داری کمتر از تیمار دیگر بود که نشان می‌دهد تأثیر Bt با گذشت زمان افزایش می‌یابد.

نتایج همچنین نشان داد که سه جدایه شامل FA-16، g44 و sh20 که از شیراز و فسا جمع‌آوری شده بودند، در ۷۲ ساعت به ترتیب با تلفات ۵۳/۳۳، ۸۰ و ۷۳/۳۳ درصد بالاترین میزان مرگ و میر لاروهای سن سوم شب‌پره‌هندی را باعث می‌شوند. در حالی‌که جدایه‌های g46-29، g45-5، TA22، 35b و E8 که نقاط دیگر قلات و شیراز و همچنین از تبریز و اصفهان جمع‌آوری شده بود، روی لارو سن سوم حشره شب‌پره هندی بی تاثیر بودند.

با افزایش آگاهی در زمینه‌ی مبارزه با آفات و اثرات سوء استفاده از سموم شیمیایی، توجه‌ها به سوی روش‌های مبارزه بیولوژیک معطوف شده و تلاش‌ها برای استفاده از پاتوژن‌ها به ویژه باکتری Bt که بخش عمده‌ی بازار مواد بیولوژیک کنترل کننده آفات را به خود اختصاص داده، رو به گسترش است. قابلیت جداسازی جدایه‌های بومی از مناطق و منابع

مختلف ویژگی مورد توجه این باکتری بوده و با استفاده از تکنیک‌های مختلف می‌توان آن‌ها را شناسایی و جدا نمود. پژوهش حاضر مؤید وجود پتانسیل بالا در زمینه استخراج جدایه‌های مختلف این باکتری در باغات و مناطق جنگلی استان فارس می‌باشد. نتایج نشان داد که تعداد زیادی از جدایه‌ها می‌توانند به نحو مطلوبی در کنترل آفات بسیار مؤثر واقع گردند. جدایه‌های Sh20، FA-16 و g44 بالاترین اثر کشندگی بعد از ۷۲ ساعت بر روی لارو حشره شب‌پره هندی را داشتند. با توجه به اینکه جدایه‌ها فاقد مواد همراه و سایر ترکیبات موجود در فرمولاسیون‌ها بوده، این مقدار تلفات حائز اهمیت و قابل توجه می‌باشد. از این رو، امید است که بتوان با معرفی جدایه‌های بومی و مؤثر این باکتری، گامی مهم در راستای تولید داخلی سموم میکروبی Bt برداشت و فرهنگ مبارزه بیولوژیک و در پی آن رسیدن به غذای سالم، بدن سالم و محیط زیست سالم را نهادینه ساخت.

References

Al-Momani, F., Obeidat, M., Saadoun, I. and Meqdam, M. 2004. Serotyping of *Bacillus thuringiensis* isolates, their distribution in different Jourdanian habitats and pathogenicity in Drosophila melanogaster. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20: 749-753.

Apaydin, O., Yenidunya, A. F., 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, S., Saferalizadeh, 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-Iran. African Journal of Microbiology Research, 4: 1224-1229.

Armengol, G., Escobar, M. C, Maldonado, M. E and Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. Journal of Applied Microbiology, 102: 77-88

Arrieta, G. and Espinoza, A. M. 2006. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. International Journal of Tropical Biology, 54 (1): 13-27.

Bae, C., Degheele, D., Janses, S. and Lambert, B. 1993. Activity of insecticidal proteins and strans of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). Journal of Invertebrate Pathology, 62: 211-215.

Bruce, M. J., Gatsi, R., Crickmore, N. and Sayyed, A. H. 2007. Mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Diamond back Moth. Biopesticides International, 3 (1): 1-12.

Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology, 32: 243-247.

Damavandian, M., Pirouz, R. and Amiri Besheli, B. 2017. Laboratory and field evaluation of *Bacillus thuringiensis* Berliner for the control of *Archips rosanus* Linnaeus in Mazandaran province. Journal of Applied Entomology and Phytopathology, 84 (2): 313-326. (in Persian with English summary)

Dutton, A., Romeis, J. and Bigler, F. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. Biocontrol, 48: 611-636.

Ejiofor, A. O. and Johnson, T. 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28: 284-290.

Finney, D. J. 1952. On the Precision of Biological Assays. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 8: 55-70.

Frouzan, M., Nuri, H., Rezaei, M. and Hasanzadeh, M. 2012. Extraction of local isolates of *Bacillus thuringiensis* from vineyard soils in Salmas and evaluation of its toxicity on larva and adults of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Plant Pests Research, 1 (1): 60-66. (in Persian with English summary)

Georghiou, G. 1994. Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection, 75 (4): 51–59.

Gibbon, D. 2011. Save and Grow: A Policymaker's Guide to the Sustainable Intensification of Smallholder Crop Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 112pp.

Grayeli Moradi, F., Mohammadi Sharif, M., Hadizadeh, A. and Babaeizad, V. 2014. Diversity of Bacillus thuringiensis isolates in various ecosystems of Mazandaran province. Journal of Natural Environment, 67 (3): 313-321. (in Persian with English summary)

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

Jara, S., Maduell, P. and Orduz, S. 2006. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and been phylloplane and their respective soils in Colombia. Journal of Applied Microbiology, 101: 117-120.

Johnson, J. A., Wofford, P. L. and Whitehand, L. C. 1992. Effect of diet and temperature on development rates, survival and reproduction of the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology, 85: 561–566.

Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovski, E., Regev, M., Koncz, C., Schell J. and Zilberstein, A. 1996. Digestion δ-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instars of Sodoptera littoralisto Cry1C. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26: 365-373.

Khetan, S. K. 2001. Microbial Pest Control. Marcel Dekker, Inc. 300p Forsyth, G.,Logan, N.A.,2000. Isolation of *Bacillus thuringiensis*from Northern Victoria Land, Antarctica. Letters in Applied Microbiology, 30: 263-266.

Khoramnezhad, A., Talaei-Hassanloui, R. and Ghassemi-Kahrizeh, A. 2015. Evaluating the virulence of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from host and different habitats on diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). Biological Control of Pests and Plant Diseases, 4(2): 167-172. (in Persian with English summary)

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.

Magholifard, Z., Hesami, S., Marzban, R. and Salehi Jouzani, G. 2020. Individual and Combined Biological Effects of Bacillus thuringiensis and Multicapsid Nucleopolyhedrovirus on the Biological Stages of Egyptian Cotton Leafworm,

Spodoptera littoralis (B.) (Lep.: Noctuidae). Journal of Agricultural Science and Technology, 22 (2): 465-476.

Mahmoudi, R., Irajian, G.H., Javadi, I. and Panahi kokhdan, E. 2017. The Molecular Characterization of Cry genes in *Bacillus thuringensis* Isolated from Soil. Armaghane danesh, 22 (2): 271-281.

Martin, P. A. W. and Travers, R. S. 1989. Worldwide abundance and distribution of Bacillus thuringiensis isolates. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 55: 2437-2442.

Marzban, R. 1997. Biological control of Plodia interpunctella in dried fruits (pistachio, walnut and almond) by Bacillus thuringiensis bacteria. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran. (in Persian with English summary)

Marzban, R. 2002. Comparative bioassay of native isolates of Bacillus thuringiensis and Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki on Indian meal moth (*Plodia interpunctella* Habner). Applied Entomology and Phytopathology, 70 (1): 83-90. (in Persian with English summary)

Mbata, G. N. and Osuji, F. N. C. 1983. Some aspects of the biology of *Plodia interpunctella* (H¨ubner) (Lepidoptera, Pyralidae), a pest of stored groundnuts in Nigeria. Journal of Stored Products Research, 19, 141–151.

Moazamian, E., Bahador, N., Rasouli, M. and Azarpira, N. 2010. Isolation, characterization and serotype classification of Bacillus thuringiensis from different soil samples of Fars province. Journal of Microbial World, 3(1): 24-30. (in Persian with English summary)

Momenzadeh, S., Hesami, S. and Gheibi, M. 2014. Biological characteristies of the *Plodia interpunctella* (Lep.: Pyralidae) on dried fig at different temperatures in laboratory conditions. Plant Protection Journal, 6 (1): 29-39. (in Persian with English summary)

Oluwafemi, A. R., Rao, Q., Wang, X. Q. and Zhang, H. Y. 2009. Effect of *Bacillus thuringiensis* on *Habrobracon hebetor* during combined biological control of *Plodia interpunctella*. Insect Science, 16: 409-416.

Phillips, T. W., Berbert, R. C. and Cuperus, G. W. 2000. Post-harvest integrated pest management, pp: 2690-2701. In: Francis, F. J. (ed.), Encyclopedia of food science and technology, 2nd ed. Wiley Inc., New York. USA.

Rampersad, J. and Ammons, D. 2005. Bacillus thuringiensis isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. BMC Microbiology, 24: 5-52.

Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R. and Je, Y. H. 2007. Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 547–559.

Romeilah, M. and Abdel-Megged, M. A. 2000. The role of certain bacterial preparations (*Bacillus thuringiensis*) in controlling the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Egytian Journal of Agricultural Research, 78: 1877-1887.

Salama, H. S., Foda, M. S. and Sharaby, A. 1989. A proposed new biological standard for bioassay of bacterial insecticides versus Spodoptera spp. Tropical Pest Management, 35: 326-330.

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 diverent ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35: 83-94.

Santana, M. A., Moccia-V C. C. and Gillis, A. 2008. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from Soil Sanples. Journal of Microbiological Methods, 75 (2): 357-358.

Sharma, H. C., Sharma, K. K., Seetartam, N. and Oritz, R. 2000. Prospects for transgenic resistance to insects. Electronic Journal of Biotechnology, 3: 37-42.

Silva, S. M. B., Silva-werneck, J. O., Falcão, R., Gomes, A. C., Fragoso, R. R., Quezado, M. T., Neto, O. B. O., Aguiar, B. J., deSá, M. F. G., Bravo, A. and Monnerat, R. G. 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strainsactive against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. Journal of Applied Entomology, 128: 102-107.

Soleimany, M., Moazamian, E. and Rasouli, M. 2018. Effect of Bacillus thuringiensis parasporal toxin on stimulating of IL-2 and IL-5 cytokines production. Biological Journal of Microorganism, 7 (25): 101-108.

Tohidi, F., Nazemi, A., and Jafarpour, M. 2012. Isolation and molecular identification of Cry genes in Bacillus thuringiensis isolates from soil of West Mazandaran. Journal of Microbial Biotechnology, 3 (11): 1-6.

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.

Vimala Devi, P. S., Duraimurugan, P. and Chandrika, K. S. V. 2019. *Bacillus thuringiensis*-based nanopesticides for crop protection, pp: 249-260. In: Koul, O. (ed). Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives, 1st ed. Academic Press, London, UK.

Yasutake, K., Uemori, A., Kagoshima, K. and Ohba, M. 2007. Serological identification and insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from the island Okinoerabu-jima, Japan. Applied Entomology and Zoology, 42 (2): 285-290.

Journal of Entomological Research
Volume 12, Issue 3, pages: 201-217

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Extraction of local isolates of *Bacillus thuringiensis* from the soils of Fars province and evaluation of their toxicity on larva of *Plodia interpunctella* (Hubner)

F. Tavangarzamin[1], Sh. Hesami[2*], E. Moazamian[3], Gh. r. Salehi Jouzani[4]

1- Ph.D. Student, Department of Entomology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2- Associate Professor, Department of Entomology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
4- Professor, Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Instituet, Karaj, Iran

Abstract

Bacillu thuringiensis (Bt) produces crystalline proteins that are toxic to various insect species. In this study, Bt strains were isolated from the soils of some areas of Fars province and their toxicity on larva of *Plodia interpunctella* (Hubner) was investigated. For this purpose, 110 strains were isolated from the soils of Shiraz, Marvdasht, Fasa and Sarvestan. Initial identification of the isolates was carried out on the basis of Gram staining and morphological characteristics of protein crystals using phase-contrast microscopy. The protein crystals of the isolates were spherical and rhombic. Molecular analysis by PCR showed that 40 isolates of the collection were contained Cry1 gene. The isolates toxicity was studied on third instar larvae of *P. interpunctella*. According to the results of this study, 2×10^8 sporeml^{-1} concentration after 72 hours was considered as the most effective treatment and the three isolates sh20, g44 and FA-16 had the highest mortality (53.33%, 80% and 73.33%, respectively) on larva of Indian meal moth. Isolates g46-29, g45-5, TA22, 35b, and E8 were ineffective on the third instar larvae of Indian meal moth. In general, the bioassay results showed that the strains isolated from the soils of the study area had considerable toxic effect on Indian meal moth larvae. We hope that introducing these native isolates of Bt will be an important step to produce domestic biological pesticides.

Keywords: Biological insecticide, *Bacillus thuringiensis*, Cry gene, Native isolate

* Corresponding Author, E-mail: hesami@iaushiraz.ac.ir
Received: 26 Aug. 2020 – Accepted: 2 Nov. 2020