جداسازی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان و ارزیابی سمیت آن‌ها روی لاروهای کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*)

Isolation of local isolates of *Bacillus thuringiensis* from forest soils of Golestan province and evaluation of their toxicity on larva of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctouidae).

مرضیه شازده احمدی[1*] و سید افشین سجادی[1]

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۴

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) یک باکتـری گرم مثبت، اسپـورزا، خاکزی، هـوازی و میلـه‌ای شکل است که مهم‌ترین عامل کنترل میکروبی آفات مهم کشاورزی از جمله بالپولکداران، سخت بالپوشان و دوبالان می‌باشد. کنترل موثر بسیاری از این آفات، مبتنی بر یافتن و کاربردی کردن جدایه‌های بومی هر کشور یا منطقه است. اولین قدم به عنوان پایه و اساس تحقیق روی باکتری Bt، جداسازی جدایه‌های بومی و نگهداری آن‌ها به عنوان بانک ژن این باکتری است. در این پژوهش ۲۴ نمونه از خاک‌های مناطق مختلف جنگلی استان گلستان با استفاده از شیوه انتخابی استات سدیم غربال شد و تعداد۶۰ جدایه باکتری Bt به دست آمد. کشت نمونه‌های اولیه خاک روی محیط کشت LBA انجام شد و گزینش اولیه کلنی‌ها بر اساس شکل ظاهری کلنی Bt روی محیط کشت و گزینش نهایی بر اساس شناسایی میکروسکوپی ویژگی‌های مرفولوژیکی کریستال آن‌ها صورت گرفت. در بررسی میکروسکوپی، اکثر جدایه‌ها تولید کننده پروتئین کریستالی دوهرمی شکل (۵۶/۶ درصد) بودند. سپس، زیست‌سنجی این جدایه‌های بومی روی لاروهای سن سوم آفت کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی زیست سنجی نشان داد که این جدایه‌ها روی لاروهای این آفت تاثیر کشندگی قابل قبولی داشته و در حدود ۵۵-۸۰ درصد تلفات نشان دادند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خاک‌های نواحی جنگلی، منبعی مناسب برای یافتن جدایه‌های موثر باکتری Bt می‌باشد.

واژگان کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، جدایه، جداسازی، *Helicoverpa armigera*، خاک‌های جنگلی

۱- محققین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

مقدمه

کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) یکی از آفات بسیار مهم توتون است که هر ساله باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون می‌گردد.کنترل آفات گیاهی با استفاده از سموم شیمیایی، خسارات جبران‌ناپذیر و تاثیر سوء بر سلامت انسان و محیط زیست وارد کرده و از نظر اقتصادی با توجه به هزینه بالای سموم شیمیایی، استفاده از عوامل کنترل میکروبی و بیولوژیک، بسیار مقرون به صرفه می‌باشد (Ammouneh *et al*., 2011). مبارزه بیولوژیکی به مفهوم به کارگیری دشمنان طبیعی به منظور کاهش جمعیت آفات است. عوامل میکروبی، اهمیت زیادی در کنترل بیولوژیک دارند و دارای مزایای زیادی هستند، به طوری‌که برای انسان و سایر موجودات غیر هدف اثر سوء ندارند، موجب کاهش بقایای سموم شیمیایی شده و نیز موجب حفظ سایر دشمنان طبیعی آفات می‌گردند (Marzban and Salehi Jouzani, 2005). باکتری (Bt) *Bacillus thuringiensis* یکی از مؤثرترین و شاخص‌ترین عامل کنترل میکروبی آفات گیاهی بوده و به عنوان یک حشره‌کش زیستی- میکروبی به شمار می‌آید. Bt یک باکتری گرم مثبت، اسپورزا، خاکزی، هوازی، میله‌ای شکل، اسپورزا و از خانواده Bacillaceae است که در طی فرآیند اسپورزایی تولید اسپور و کریستال‌های سمی می‌کند که حاوی یک یا تعداد بیش‌تری توکسین Cry است و برای راسته‌های مختلف حشرات، سمی می‌باشد (Keshavarzi, 2008). ایشیواتا (۱۹۰۱) باکتری اسپوردار هوازی را از کرم ابریشم جداسازی کرد و آن را *Bacillus sotto* یا Sudden- collapsebacillus نام نهاد (Ishiwata, 1901). در تحقیقی دیگر، باکتری مشابهی از پروانه آرد گندم (*Anagasta kuhniella* zell.) جداسازی گردیدکه آن را Bt نام‌گذاری کردند. سپس، پروتئین‌های کریستالی را که دارای حداقل ۱۷ اسید آمینه بودند از باکتری Bt به طور خالص به‌دست آوردند (Hannay and Fitz, 1955).

مزیت عمده باکتری Bt اختصاصی بودن آن برای میزبان‌های مختلف است، به طوری‌که برای حشرات و گیاهان دیگر، اثر سمیت ندارد و دارای مزیت ایمنی زیست محیطی نیز می‌باشد. نحوه عملکرد باکتری Bt بدین صورت است که کریستال‌های پروتئینی پس از هضم توسط پروتئازهای موجود در قسمت میانی مجرای هاضمه حشره به جاهای ویژه‌ای در رأس ریزپرزهای سلول‌های مخاطی مجرای هاضمه لاروها می‌چسبند و پس از چسبیدن، وارد فضای پلاسمایی سلول و ایجاد جراحت و زخم شده و موجب پاره شدن دیواره روده و عفونت خون و نهایتا مرگ حشره می‌گردند (Feitelson *et al*., 1992). دامنه میزبانی جدایه‌های باکتری Bt بسیار متنوع بوده و حتی روی یک گونه حشره، شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها با هم تفاوت زیادی دارند. این تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع شرایط جغرافیایی و میزبان‌های مختلف این باکتری بوده که موجب تفاوت در کریستال‌های پروتئینی و توکسین‌های آن‌ها شده و آن‌ها را می‌توان از اغلب نقاط دنیا جمع‌آوری نمود (Adang, 1991). این باکتری در طبیعت از زیستگاه‌های مختلف مانند خاک، گرد و غبار، محصولات انباری، لارو حشرات مرده و بیمار و محیط پرورش کرم ابریشم گزارش شده است. در بررسی‌هایی که در کشورهای مختلف انجام شده، Bt اغلب از خاک به دست آمده است (Chilcott and wigley, 1993).

محققان، مهم‌ترین عامل بقا و دوام باکتری‌های *B. thuringiensis* و *B. cereus* در خاک را مواد غذایی قابل دسترس می‌دانند (Dulmage and Aizawa, 1989). کریستال یا توکسین اصلی باکتری Bt به صورت حشره‌کش اختصاصی عمل کرده و روی موجودات غیر هدف اثر نداشته و یا اثرات سوء کمی دارند (Anear *et al*., 1997). با توجه به اینکه در مناطق مختلف ایران، جدایه‌های این باکتری به صورت پراکنده یافت می‌شوند، شناسایی جدایه‌های بومی و سازگار با شرایط اقلیمی هر منطقه به منظور یافتن عوامل کنترل کننده طبیعی آفات به عنوان گام نخست و آگاهی از دامنه میزبانی و شدت بیماری‌زایی آن‌ها روی آفات هدف به عنوان گام بعدی می‌باشد (Marzban and Salehi Jouzani, 2006).

برای ارزیابی تفاوت‌های بیولوژیک بین جدایه‌های بومی باکتری Bt و اندازه‌گیری فعالیت اسپور و کریستال آن‌ها جهت معرفی مؤثرترین جدایه‌ها با بیش‌ترین درصد مرگ و میر لاروی، آزمایشات زیست‌سنجی (Bioassay) روی حشره میزبان انجام می‌شود (Marzban, 2002). هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر کشندگی و سمیت چند جدایه بومی باکتری

Bt که از خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان جمع‌آوری شده بودند، روی لاروهای کرم غنچه توتون در شرایط آزمایشگاهی بود تا مؤثرترین جدایه‌ها و غلظت مناسب آن‌ها که دارای بالاترین درصد تلفات و مرگ و میر لاروی هستند، شناسایی گردند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های خاک

نمونه‌برداری از مناطق جنگلی استان گلستان، به طور تصادفی از سطح خاک تا عمق حدود ۱۵ سانتی‌متری بوسیله بیلچه استریل انجام گرفت. حدود ۲۰۰ گرم خاک نمونه‌برداری شد و به طور جداگانه در داخل کیسه‌های پلاستیکی با رعایت شرایط استریل و با قید مشخصات مندرج روی آن، قرار داده شد. نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ °C تا زمان استفاده نگهداری شدند. مشخصات نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جداسازی اختصاصی باکتری Bt از خاک

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی استات سدیم استفاده شد (Travers *et al*., 1987). بدین طریق که یک گرم از نمونه خاک به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع محتوی استات سدیم M ۰/۲۵ (PH= 6/8) کشت داده شد. استات سدیم به طور اختصاصی مانع جوانه‌زنی اسپورهای Bt می‌شود. یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت داده شده به مدت۲۰ دقیقه تحت شوک حرارتی ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه‌زده سایر باکتری‌ها از بین رفته و تنها اسپورهای مقاوم و جوانه نزده Bt باقی می‌مانند. سپس، نمونه‌ها روی محیط کشت اختصاصی Bt (LBA[1]) کشت داده شدند. پس از گذشت ۵-۳ روز از کشت، کلنی‌های باکتری بر اساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و در داخل آب نمک ۰/۹ درصد در داخل یخچال با دمای ۴ °C تا زمان استفاده بعدی نگهداری شدند.

کشت باکتری و شناسایی میکروسکوپی کریستال

نمونه‌های نگهداری شده در آب نمک با استفاده از یک لوپ برداشته شده و روی محیط کشت جامد LBA کشت داده شدند. برای گروه‌بندی باکتری Bt از لحاظ فرم شکلی کریستال‌ها از روش رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول کوماسی بریلیانت بلو استفاده شد. برای اینکار از جدایه‌هایی که به مدت ۵-۳ روز روی محیط LBA کشت داده شده بودند، اسلاید میکروسکوپی تهیه شد و بعد از خشک شدن آن‌ها در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه در معرض محلول کوماسی بلو قرار گرفتند و بعد از شستشو و خشک شدن، زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰ بر اساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (اسپور، کلاهک و کریستال) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند.

تهیه محلول باکتریایی از جدایه‌ها

برای انجام تست‌های سمیت (زیست‌سنجی)، تمام سطح رویی محیط کشت مربوط به هر جدایه به طور جداگانه، توسط لوپ مناسب جمع‌آوری و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و خوب به هم زده شد و غلظت پایه (CFU/ ml) 1×10^{8} تهیه شد و سپس، سایر غلظت‌ها به روش سری رقت از آن خالص‌سازی و تهیه شدند و سوسپانسیون حاصل، در آزمایشات زیست‌سنجی و سمیت روی لاروهای حشره میزبان به کار رفت.

1- Luria Bertani Agar

جدول ۱- مشخصات مناطق نمونه برداری از خاک‌های نواحی جنگلی استان گلستان

Table 1. Characterization of sample locations from forest soils of Golestan province

Height of sea level (m)	عرض جغرافیایی Geo. Latitude	طول جغرافیایی Geo. Longitude	Date of collection	تاریخ جمع آوری	Name of forest sample location	نام جنگل منطقه جمع آوری	No. of sample
678 m	55° 28´ 50/1´´E	37° 13´ 3/8´´N	2016/5/30	۱۳۹۵/۳/۱۰	Galikesh forest	جنگل گالیکش	1
697 m	55° 20´ 50´´E	37° 13´ 29/9´´N	2016/6/1	۱۳۹۵/۳/۱۲	Kalaleh forest	جنگل کلاله	2
498 m	55° 28´ 25/4´´E	37° 8´ 46/7´´N	2016/6/5	۱۳۹۵/۳/۱۶	Gholitapeh minodasht forest	جنگل قلی تپه مینودشت	3
445 m	55° 28´ 32/2´´E	37° 10´ 14/1´´N	2016/6/5	۱۳۹۵/۳/۱۶	Chehehchai minodasht forest	جنگل چهل چای مینودشت	4
319 m	55° 7´ 20/7´´E	36° 59´ 9/7´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Tashteh Ramiyan forest	جنگل تاشته رامیان	5
309 m	55° 8´ 3/7´´E	36° 59´ 31/5´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Dare mola Ramiyan forest	جنگل دره ملا رامیان	6
104 m	55° 5´12/3´´E	37° 2´ 37/2´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Daland forest park	پارک جنگلی دلند	7
120 m	55° 2´ 30/7´´E	36° 58´ 38/7´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Khan Bebin forest	جنگل خان ببین	8
114 m	55° 1´ 2/8´´E	36° 58´ 41´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Azadshahr forest	جنگل آزادشهر	9
411 m	54° 27´ 50/5´´E	36° 47´ 29/9´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Alang Dareh Gorgan forest	جنگل النگ دره گرگان	10
486 m	54° 28´ 7/3´´E	36° 46´ 15/2´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Naharkhoran Gorgan forest	جنگل ناهارخوران گرگان	11
471 m	54° 34´48/9´´E	36° 46´ 33/5´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Tooskestan Gorgan forest	جنگل توسکستان گرگان	12
180 m	54° 40´ 3/7´´E	36° 50´ 45/5´´N	2016/6/1	۱۳۹۵/۳/۱۲	Mohamadabad Nodehmalek	جنگل محمدآباد نوده ملک	13
139 m	54° 40´ 35/4´´E	36° 52´ 54/5´´N	2016/6/1	۱۳۹۵/۳/۱۲	Ghorogh forest	جنگل قرق	14
408 m	54° 38´ 21/8´´E	36° 54´ 18/5´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Gorgan Ziyarat forest park	پارک جنگلی زیارت گرگان	15
112 m	54° 7´ 38/4´´ E	36° 42´ 35/2´´N	2016/5/31	۱۳۹۵/۳/۱۱	Kordkoy EmamReza forest park	پارک جنگلی امام رضا کردکوی	16
150 m	53° 53´ 19/6´´E	36° 41´ 58/9´´N	2016/5/31	۱۳۹۵/۳/۱۱	Bandargaz forest	جنگل بندرگز	17
171 m	53° 45´ 14/1´´E	36° 40´ 17/9´´N	2016/5/31	۱۳۹۵/۳/۱۱	Nokandeh forest	جنگل نوکنده	18
45 m	53° 50´ 34/9´´E	36° 43´ 4/1´´N	2016/5/31	۱۳۹۵/۳/۱۱	East Livan forest	جنگل لیوان شرقی	19
32 m	53° 47´ 21/4´´E	36° 41´ 5/7´´N	2016/5/31	۱۳۹۵/۳/۱۱	West Livan forest	جنگل لیوان غربی	20
695 m	55° 28´ 29/4´´E	37° 18´ 40/7´´N	2016/6/7	۱۳۹۵/۳/۱۸	Maravehtappeh forest	جنگل مراوه تپه	21
398 m	54° 38´ 7/3´´E	36° 42´ 45/2´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Gorgan Valeshabad forest	جنگل والش آباد گرگان	22
578 m	55° 21´ 35/1´´E	37° 27´ 41/9´´N	2016/6/5	۱۳۹۵/۳/۱۶	Minodasht Dozein forest	جنگل دوزین مینودشت	23
410 m	54° 48´ 7/3´´E	36° 32´ 25/2´´N	2016/6/8	۱۳۹۵/۳/۱۹	Gorgan Taghartapeh forest	جنگل تقرتپه گرگان	24

پرورش آزمایشگاهی حشره میزبان

لاروهای کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) در اواخر تیرماه از مزرعه تحقیقاتی توتون مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای پرورش لارو از غذای مصنوعی به روش Teakle and Jensen (1985) استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا محیط غذای مصنوعی، (شامل لوبیا چشم بلبلی خیس خورده، مخمر، پودر جوانه گندم، اسید آسکوربیک، فرمالدئید۳۷ ٪، روغن آفتابگردان، آگار، متیل پاراهیدروکسی بنزوات، اسید آسکوربیک و آب مقطر) بعد از مخلوط شدن مواد با یکدیگر، داخل پتری‌های شیشه‌ای ریخته شد و برای مصارف بعدی در یخچال نگهداری گردید. پرورش لاروها روی غذای مصنوعی و به صورت دسته جمعی در ظرف‌های پلاستیکی شفاف دربدار و لاروهای سنین بالاتر به صورت انفرادی در قوطی‌های خالی فیلم عکاسی انجام شد. در هر قوطی یک قطعه غذای مصنوعی کوچک قرار داده و یک روز در میان تعویض شد. شفیره‌ها به طور روزانه جمع‌آوری و به داخل ظرف‌هایی به ابعاد ۵/۵ × ۱۸ × ۱۱ سانتی‌متر حاوی خاک اره منتقل شدند. حشرات بالغ نیز هر روز جمع‌آوری و برای تخم‌گذاری، به ظرف‌های استوانه‌ای از جنس پلاستیک شفاف (به ابعاد ۱۷ × ۳۵ سانتی‌متر) حاوی توری‌های سلولزی جاذب رطوبت منتقل شدند. برای تغذیه پروانه‌ها، گلوله‌های پنبه‌ای آغشته به آب و قند ۱۰ ٪ روی توری قرار داده می‌شود. حشرات بالغ نر و ماده پس از جفت‌گیری روی تورهای تنزیب تخم‌ریزی می‌کردند. این تورها به‌طور روزانه تعویض شده و سپس هر کدام به تنهایی در پلاستیکی قرار داده می‌شدند. یک پنبه خیس جهت حفظ رطوبت در هر پلاستیک قرار داده شد. تخم‌ها پس از ۳-۴ روز دوره کمون، در اتاقک رشد در شرایط کنترل شده دما ۲ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت، تفریح شدند. تعداد لاروها روزانه حاصل، شمارش و ثبت شدند.

آزمایشات زیست‌سنجی جدایه‌های باکتری

به منظور ارزیابی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری Bt در میزبان، آزمایشات زیست‌سنجی (تست سمیت) انجام شد. آزمایشات زیست‌سنجی جدایه‌های مختلف باکتری Bt در چهار غلظت مختلف (۱×۱۰^{۸}- ۲×۱۰^{۷} – ۳×۱۰^{۶}- ۶×۱۰^{۶}) روی لاروهای سن ۳ کرم غنچه توتون در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملا تصادفی با ۳ تکرار در سطح پتری در آزمایشگاه انجام شد. بدین صورت که هر لارو به طور جداگانه درون پتری دیش‌های محتوی ۲ گرم از غذای حشره که به طور جداگانه، آغشته به سوسپانسیون‌های فوق بود، قرار داده شد. از فرآورده Bt تجاری موجود در بازار به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتریایی، از آب مقطر استریل استفاده گردید. آماربرداری از درصد مرگ و میر لاروی ۱، ۳، ۵ و ۷ روز بعد از اعمال تیمار انجام و ثبت شد. درصد مرگ و میر لاروی طبق فرمول Abbot (1925) که در زیر ذکر شده است، محاسبه گردید.

$$M\ [\%] = [\ (t - c) \setminus (100 - c)\ ] \times 100$$

M % = درصد مرگ و میر محاسبه شده

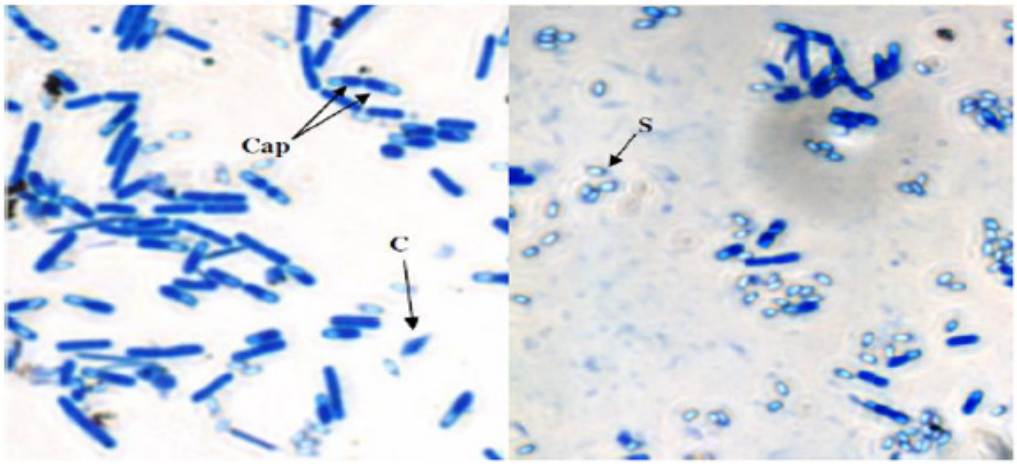
t= مرگ و میر در تیمار

c= مرگ و میر در شاهد

داده‌های حاصل از زیست‌سنجی با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش، از ۲۴ نمونه خاک متعلق به نواحی جنگلی استان گلستان، با استفاده از روش گزینش انتخابی توسط استات سدیم، تعداد ۶۰ جدایه باکتری بر اساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و داخل آب نمک ۰/۹٪ نگهداری شدند. گزینش نهایی جدایه‌های جداسازی شده بر اساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی و تهیه اسلاید و مشاهده کلنی‌ها زیر میکروسکوپ، کریستال، اسپور و کلاهک این باکتری مشاهده شد (شکل ۱). جدایه‌های شناسایی شده بر اساس شکل کریستال پروتئین به ۵ گروه شامل دوهرمی، کروی، بیضی، دوهرمی و بیضی و نامنظم طبقه‌بندی شدند که از بین آن‌ها ۳۴ جدایه دوهرمی، ۶ جدایه کروی، ۸ جدایه بیضی، ۸ جدایه دوهرمی و بیضی و ۴ جدایه نامنظم بودند.



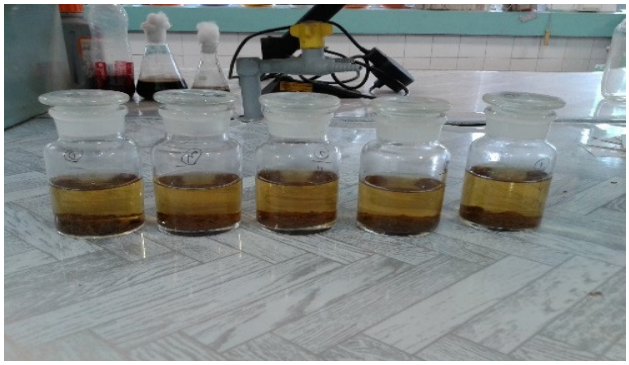
شکل ۱- کریستال (C)، اسپور (S) و کلاهک (Cap) باکتری *Bacillus thuringiensis* مشاهده شده در زیر میکروسکوپ (بزرگنمایی × ۱۰۰)

Fig. 1. Crystal (C), Spore (S) and Cap of *Bacillus thuringiensis* observed under the microscope (Zoom × 100)

شکل ۲- مراحل جداسازی باکتری Bt از نمونه‌های خاک شکل شکل

Fig. 2. Isolation stages of Bt from soil samples

شکل ۳- کلنی‌های رشد یافته باکتری Bt روی محیط LBA
Fig. 3. Bacterial colonies grown on LBA medium



شکل ۴- پرورش مصنوعی حشره میزبان و انجام مراحل زیست‌سنجی
Fig. 4. Artificial training of host insect and bioassay

یافتن جدایه‌هایی با پتانسیل حشره‌کشی بالا، در درجه اول نیازمند نمونه‌برداری، غربالگری و جداسازی از مکان‌های جغرافیایی مختلف است. بر اساس بیش‌تر پژوهش‌هایی که روی باکتری Bt انجام گرفته است، خاک زیستگاه طبیعی و اصلی این باکتری است. از این رو در این پژوهش نیز خاک‌های اکوسیستم‌های مناطق جنگلی استان گلستان برای جداسازی باکتری Bt بررسی شد. در پژوهش کنونی نیز، تعداد قابل توجهی جدایه بومی باکتری Bt جداسازی شد که نشان‌دهنده فراوانی قابل توجه این باکتری در نمونه‌های خاکی است و این مطلب در پژوهش حاضر نیز تایید شد.

بر اساس یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt از خاک، مشخص شد که اکثر گونه‌های *Bacillus thuringiensis* که روی محیط کشت اختصاصی رشد یافته بودند، تولید کریستال‌های پروتئینی دوهرمی کردند (Travers *et al*., 1987). در بررسی جدایه‌های باکتری Bt در کشور بنگلادش، بیش‌ترین فرم و شکل کریستال پروتئین جدایه‌ها را دوهرمی گزارش کردند (Anear *et al*., 1997). گرایلی و همکاران (۲۰۱۴)، از ۳۲ نمونه خاک مناطق جنگلی استان مازندران، تعداد ۱۴۴ جدایه بومی Bt را بر اساس روش انتخابی استات سدیم جداسازی کردند و بیش‌ترین فرم کریستال پروتئینی جدایه‌ها را دوهرمی و بعد از آن، کروی و بیضوی شناسایی کردند که نتایج آن‌ها با نتایج حاصل از تحقیق کنونی مطابقت داشت (Grayeli *et al*., 2014).

بیش از چند هزار جدایه Bt از خاک جداسازی شده است که از لحاظ فنوتیپ، ژنوتیپ و قدرت بیماری‌زایی متغیر هستند. مهم‌ترین فاکتور اکولوژیکی موثر در حفظ و بقای این باکتری در خاک، مواد غذایی قابل دسترس خاک شناخته

شده است. همچنین احتمال حضور باکتری Bt در خاک‌های فقیر و بدون پوشش گیاهی مناسب، کم‌تر از خاک‌های غنی می‌باشد (Martin and Travers, 1989).

نتایج تحقیق کنونی، نشان داد که گرچه باکتری Bt تنها در صورت وارد شدن به چرخه زیستی حشرات مؤثر است، اما به خوبی در خاک‌های مناطق مختلف پراکنده می‌باشد. یافته شدن جدایه‌های بومی Bt در خاک‌های نواحی مختلف و پراکنش زیاد آن در خاک‌های جمع‌آوری شده از نواحی مختلف جنگلی استان گلستان، امکان جست و جو برای یافتن جدایه‌های بومی مؤثر را آسان‌تر می‌کند. بنابر این، خاک‌های نواحی جنگلی، منبعی مناسب برای یافتن جدایه‌های مؤثر بومی باکتری Bt برای کنترل بیولوژیک آفات هستند. با توجه به این‌که در مناطق مختلف کشور، جدایه‌های این باکتری به صورت پراکنده یافت می‌شوند، لازم و ضروری است که برای جمع‌آوری جدایه‌های بومی و موثر هر منطقه قبل از ورود جدایه‌های غیر بومی هر چه سریع‌تر اقدام شود، زیرا جدایه‌های بومی با شرایط اقلیمی و جغرافیایی همان منطقه سازگاری بیش‌تری داشته و مؤثرتر عمل می‌کنند (Izadyar *et al*., 1998).

نتایج تجزیه واریانس آزمون زیست‌سنجی تأثیر جدایه‌های بومی باکتری Bt بر کرم غنچه توتون نسبت به شاهد (فرآورده تجاری Bt) در شرایط آزمایشگاه، نشان دادکه اثر باکتری Bt، غلظت و اثر متقابل باکتری Bt× غلظت، از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲). مقایسه میانگین تاثیر سویه‌های بومی Bt بر کرم غنچه توتون نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه نشان داد که جدایه‌های Bt حاصل از نمونه‌های ۲ و ۳ با غلظت CFU/ $۲×۱۰^{۷}$ml به عنوان برترین و بهترین جدایه‌های Bt بومی مناطق جنگلی استان گلستان شناخته شده که به تنهایی دارای ۸۰ درصد اثر کشندگی علیه لاروهای این آفت بوده و در بالاترین رتبه (رتبه a) قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر جدایه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* بر کرم غنچه توتون نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه

Table 2. Variance analysis the impact of native isolates of Bt on *Helicoverpa armigera* compared to control in vitro condition.

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	سطح معنی‌داری Significance level (Pr>f)	میانگین مربعات MS.
تکرار Replication	2	-	0.13
باکتری Bt	24	0.0001	3591.93**
غلظت Concentration	3	0.0001	3080.89**
باکتری Bt× غلظت concentration Bt ×	72	0.0001	21.71**
خطا Error	198	-	1.11
ضریب تغییرات (درصد) CV%			2.33

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**: Significant at 1% level of probability

در تحقیقی، انتشار و پراکندگی باکتری Bt در ۲۲۰۰ نمونه خاک زراعی مربوط به استان‌های مختلف ایران بررسی شد. پس از جداسازی و شناسایی جدایه‌های مذکور، زیست‌سنجی این جدایه‌ها را روی لاروهای سن دوم آفت کرم غوزه پنبه (*Heliothis armigera*) درون پتری دیش در شرایط آزمایشگاهی انجام دادند. نتایج تحقیق مشخص نمود که زیستگاه اصلی باکتری Bt در خاک بوده و قدرت بیماری‌زایی متفاوت در جدایه‌های Bt، مربوط به اختلافات جغرافیایی و آب و هوایی مناطق مختلف ایران می‌باشد (Marzban and Salehi Jouzani, 2006). در پژوهشی، زیست سنجی و کارایی ۱۲ جدایه Bt بومی استان تهران به همراه فرآورده تجاری Dipel® به عنوان شاهد روی لاروهای سن دوم آفت کرم غوزه پنبه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که هر چقدر طول مدت زمان تغذیه برای دریافت دوز مؤثر کوتاه‌تر باشد، اثر باکتری Bt سریع‌تر است. LC50 جدایه موثر CFU ۱۰۶ × ۶ در میلی‌لیتر به دست آمد که نسبت به شاهد با دوز کشندگی CFU ۱۰۶ × ۸ اثر کشندگی یکسانی را روی آفت مذکور داشت (Izadyar *et al*., 2002).

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد کنترل‌کنندگی و تأثیر جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* بر *Helicoverpa armigera* نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه

Table 3. Average comparison of mortality percentage and impact of native isolates of *Bacillus thuringiensis* on *Helicoverpa armigera* compared to control at in vitro condition.

۳×۱۰^۶ 3×10^6	۶×۱۰^۶ 6×10^6	۱×۱۰^۷ 1×10^7	۲×۱۰^۷ 2×10^7	Bt treatment	تیمار Bt
60 IG	62 GHI	72/1 C	78 a	Sample 1	نمونه ۱
58/8 JK	62 GHI	72/1 C	80 a	Sample 2	نمونه ۲
62 GHI	65 F	75 B	80 a	Sample 3	نمونه ۳
24 V	31 R	37 OP	40 N	Sample 4	نمونه ۴
60 IJ	62 GHI	71 CD	75 B	Sample 5	نمونه ۵
24 V	31 R	37 OP	40 N	Sample 6	نمونه ۶
24 V	31 R	37 OP	40 N	Sample 7	نمونه ۷
60 IJ	64 FG	68/8 E	75 B	Sample 8	نمونه ۸
24 V	31 R	37 OP	40 N	Sample 9	نمونه ۹
24 V	31 R	37 Op	40 N	Sample 10	نمونه۱۰
50 M	57 K	65 F	72/1 C	Sample 11	نمونه۱۱
24 V	31 R	37 OP	40 N	Sample 12	نمونه۱۲
50 M	56/6 K	63/3 FGH	70 DE	Sample 13	نمونه۱۳
50 M	57 K	58/8 JK	68/8 E	Sample 14	نمونه۱۴
60 IJ	57 K	61/1 E	70 DE	Sample 15	نمونه۱۵
60 IJ	65 F	68 E	71 CD	Sample 16	نمونه۱۶
28 TU	31 R	33 QR	35 PQ	Sample 17	نمونه۱۷
50 M	54 L	57 K	63/3 FGH	Sample 18	نمونه۱۸
24 V	26 UV	28 TU	35PQ	Sample 19	نمونه۱۹
24 V	26 UV	28 TU	35 PQ	Sample 20	نمونه۲۰
24 V	26 UV	28 TU	33 QR	Sample 21	نمونه۲۱
24 V	26 UV	28 TU	33 QR	Sample 22	نمونه۲۲
24 V	26 UV	28 TU	33 QR	Sample 23	نمونه۲۳
24 V	26 UV	28 TU	33/3 Q	Sample 24	نمونه۲۴
20 W	33/3 Q	40 N	48/8 M	Control	شاهد(تجاری)

در تحقیقی دیگر، جدایه‌های بومی باکتری Bt در کشوراردن جداسازی شده و سمیت آن روی لاروهای آفت *Ephestia kuheniella* zeller. مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده بیش‌ترین درصد تلفات جدایه‌ها علیه لاروهای این آفت بین ۵۵-۸۰ درصد است (Obeidat *et al*., 2004). در پژوهشی دیگر، جدایه‌های بومی باکتری Bt را از خاک تاکستان‌های شهرستان سلماس در استان آذربایجان غربی جداسازی کرده و سمیت این جدایه‌ها را روی لارو و حشرات کامل آفت *Tribolium castaneum* بررسی کرده و دریافتند که این جدایه‌های بومی روی حشرات کامل ۴۰-۵۰ درصد و روی لاروهای این آفت بین ۵۰-۸۰ درصد تلفات و مرگ و میر نشان می‌دهد (Frouzan *et al*., 2012).

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت و معاون محترم پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش و همچنین از همکاری آقایان مهندس شهادتی مقدم و مهندس مسعودی، دکتر غلامرضا صالحی جوزانی و خانم دکتر هدی عاصمی در انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Abbot, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.

Adang, M. J. 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. Pp. 3-24. In: Maramosch, K. (ed.) Biotechnology for biological control of pests and vector. CRC press.

Ammouneh, H., Harba, M., Idris, E. and Makee, H. 2011. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soils and testing of their insecticidal activities against some insect pests. Turkish Journal of Agriculture 35: 421-431.

Anear, H. Ahmad, S. and Sirajal, H. 1997. Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soils of Bangladesh 70: 221-225.

Chilcott, C. N. and and Wigley, P. J. 1993. Isolation and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. Journal of Invertebrate pathology 61: 244-247.

Dulmage, H. and Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. Pp. 209-237. In: Kurstak, E. (ed.) Microbial and Viral pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York.

Feitelson, J. S., Payne, J. and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Biotechnology 10: 271-275.

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

Grayeli, F., Mohammadi Sharif, M., Hadizadeh, A. and Babayizad, V. 2014. Identification of genetical structure of native strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from forest soils of Golestan province. Journal of Biotechnology in Agriculture 13(1): 313-321. (In Persian)

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

Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (Sotto disease). I. Dianihen sanshi kaiho 114, 1(cited in the safety of microbial insecticides, pp. 36-36).

Izadyar, S., Amirsadeghi, S. and Rohani, H. 1998. Isolation of native strains *Bacillus thuringiensis* from Agricultural soil of Northern Iran. Abstract of Sixteenth Iranian Plant Protection Congress P: 198. (In Persian)

Izadyar, S., Askari, H. and Talebi Jahromi, KH. 2002. Bioassay of several Iranian isolates of *Bacillus thuringiensis* on *Helicoverpa armigera*. Journal of plant pests and diseases 73(1): 30-44.

Keshavarzi, M. 2008. Isolation, Identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. Journal of Agricultural science & Technology 10: 493-499.

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

Marzban, R. 2002. Bioassay comparison of several isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki on *Plodia interpunctella* Hb. Journal of plant pests and diseases 70(1): 83-90. (In Persian)

Marzban, R. and Salehi Jouzani, GH. R. 2006. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soils of Iran. Biotechnology, Agriculture and the food Industry 4: 95-100.

Marzban, R. and Salehi Jouzani, GH. R. 2005. Isolation of native strains of *Bacillus thuringiensis* from agricultural soils of Iran. Journal of New sustainable Agriculture 2: 47-54. (In Persian)

Obeidat, M., Hassawi, D. and Ghabeish, I. 2004. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuhniella* zeller. African Journal of Biotechnology 3: 622-626.

Teakle, R. E., Jensen, J. M. 1985. *Heliothis armigera*. Pp. 313-322. In: Singh, P. and Moor, R. F. (eds.) Handbook of insect rearing.

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.