زیست‌سنجی دو جدایه ایرانی *Bacillus thuringiensis* (YD5 and 81) بر روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

Bioassay study of two native Iranian isolates of *Bacillus thuringiensis* (YD5 and 81) on *Leptinotarsa decemlineata* Say

مریم مهدوی[۱]، محمدرضا رضاپناه[۲]، قدیر نوری قنبلانی[۳]، غلامرضا صالحی جوزانی[۴] و ندا خردپیر[۵*]

دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۲

چکیده

زیست‌سنجی دو جدایه بومی (YD5 و 81) از باکتری *Bacillus thuringiensis* بر روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) به عنوان آفت جدی سیب‌زمینی انجام گرفت. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین درصد تلفات لاروهای سن ۲ سوسک کلرادو نشان داد که در تمامی غلظت‌ها جدایه استاندارد با اختلاف معنی‌دار نسبت به دو جدایه ایرانی قرار داشت. علیرغم عدم مشاهده نتایج قابل قبول از جدایه‌های بومی، این جدایه‌ها در غلظت‌های بالاتر تلفات امیدبخشی را نشان دادند.

واژگان کلیدی: *Leptinotarsa decemlineata*، *Bacillus thuringiensis*، YD5، 81

۱- دانش‌آموخته حشره‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

۵- استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین -پیشوا، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: n.kheradpir@gmail.com

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner از رده باکتری‌های مستقل از نور و متعلق به خانواده Bacillaceae می‌باشد (Sneath, 1986). این باکتری گرم مثبت و اسپورزا است و به گونه‌های دیگر *Bacillus* نظیر *B. cereus* بسیار شبیه بوده و دارای زیرگونه‌های متعددی است که اغلب در طول مرحله اسپورزایی در بدن خود تولید کریستال‌های پروتئینی می‌کنند (تاجبخش، ۱۳۶۸). این باکتری دارای زیرگونه‌ها و جدایه‌های متعددی است که برای مثال در ایران مرزبان (۱۳۷۶) یک ایزوله‌ی بومی Bt را از خاک‌های زراعی کرمانشاه جداسازی نمود. همچنین یک استرین بومی Bt از لاروهای بیمار ابریشم بافناجور از منطقه کهکیلویه و بویراحمد متعلق به زیرگونه *kurstaki*، جداسازی شده است (ایزدیار و همکاران، ۱۳۷۶). طی سال‌های ۸۰-۱۳۷۸ از خاک‌های مزارع قسمت‌های مختلف ایران ۲۲۳۴ نمونه باکتری Bt جداسازی گردید که به ۱۲۸ جدایه مختلف متعلق بوده‌اند (Marzban, 2002). ریاضی و همکاران (۱۳۸۹) به ردیابی ژن‌های مؤثر در ۵۰ جدایه Bt متعلق به استان‌های همدان و خراسان پرداختند. فروزان و همکاران (۱۳۹۰) از مزارع خاک شهرستان سلماس ۲۵ جدایه مختلف باکتری Bt را جداسازی نموده و کارآیی آن‌ها را بر روی *Tribolium castaneum* مورد بررسی قرار دادند. هشت جدایه باعث کاهش جمعیت لاروهای میزبان بین ۷۵-۲۵٪ گردیدند. همچنین در تحقیق دیگری ۲۵ جدایه مختلف از خاک مزارع استان مازندران جداسازی و ژن cry مسئول تولید پروتئین کریستالی در آن‌ها ردیابی شد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده وجود یک سویه مشابه با IBL 200 و دارای ژن cry از کلاس 1Aa بود (توحیدی و همکاران، ۱۳۹۰). خرم‌نژاد و همکاران (۱۳۹۴) طی نمونه‌برداری از خاک مزارع چهار استان گیلان، مازندران، البرز و آذربایجان غربی تعداد ۱۴۸ نمونه خاکی را از نظر وجود Bt مورد بررسی قرار داده و ۶۷ جدایه معرفی نمودند که تنها ۱۰ جدایه دارای زهرآگینی بالا بر روی بید کلم بود. در تحقیقات مشابه در خارج از کشور نیز جدایه‌هایی از این باکتری از محصولات انباری توسط Meadows (۱۹۹۳) گزارش شد. Bernhard و همکاران (۱۹۹۷) از ۲۳۶۳ نمونه شامل خاک، مواد انباری، بقایای حشرات، مواد گیاهی و سایر بسترها از ۸۰ کشور در کل ۵۳۰۳ ایزوله Bt دارای کریستال جدا نمودند که ۴۵/۵ درصد ایزوله‌ها از مواد انباری، ۲۵/۳ درصد از خاک، ۱۰/۶ درصد از بقایای بدن حشرات، ۳/۴ درصد از مواد گیاهی و مابقی ۱۵/۳ درصد از موادی غیر از مواد مذکور جدا شدند.

سوسک برگخوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* یا سوسک کلرادو آفتی است بومی آمریکای شمالی می‌باشد (Say, 1823). در تحقیقات متعدد بر روی میزان کارآیی روش‌های مختلف مدیریتی بر روی سوسک کلرادو سیب‌زمینی، اردبیلی (۱۳۷۱) اثر چند ماده حشره‌کش روی سوسک کلرادو را در مزارع سیب‌زمینی اردبیل بررسی کرد. همچنین در تحقیق دیگری روش‌های مبارزه شیمیایی و غیرشیمیایی در کاهش جمعیت سوسک کلرادو بررسی و ارزیابی اقتصادی و زیست محیطی آن‌ها صورت گرفت (اردبیلی و همکاران، ۱۳۷۶). قاسمی کهریزه و همکاران (۱۳۸۱) تاثیر باکتری Bt روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادو را مورد مطالعه قرار دادند. مقایسه تاثیر برخی حشره‌کش‌های شیمیایی و بیولوژیکی در کنترل سوسک کلرادو در مزارع سیب‌زمینی میاندوآب انجام شد (رنجی و همکاران، ۱۳۸۴). نظریان (۱۳۸۶) غربال مولکولی ایزوله‌های بومی با کنترل Bt موثر بر راسته سخت بالپوشان بر اساس ژن‌های *cry* و *vip* را انجام داد.

یکی از کاراترین روش‌هایی که برای غربال کردن میکروارگانیسم‌ها و تعیین بیماری‌زایی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیست‌سنجی است. در حقیقت زیست‌سنجی روشی است که برای تعیین اثرات بیولوژیکی عوامل کنترل کننده میکروبی در غلظت معلوم تحت شرایط کنترل شده انجام می‌شود. اثرات بیولوژیکی مورد نظر شامل تأخیر در رشد، کاهش وزن شفیره، بدشکلی حشره و در نهایت مرگ و میر لارو و یا حشره کامل می‌باشد. هدف از این مقاله برداشتن گامی در راستای حرکت به سوی مدیریت تلفیقی آفات و تسهیل استفاده از عوامل بیمارگر حشرات در کنترل بیولوژیک آفات می‌باشد. از آن‌جایی‌که Bt یک میکروارگانیسم عمومی خاکزی با تنوع گسترده و پراکنش قابل ملاحظه است لذا با

مطالعـات وسیع در جهت شنـاسـایی نژادهای مختلف این باکتری در مناطق اکولوژیکی کشور می‌توان به جدایه‌های جدیدی که با شرایط اقلیمی هرمنطقه سازگاری بیش‌تری دارند دست یافت که می‌تواند برای آفات کلیدی و مهم نظیر سوسک برگخوار سیب‌زمینی موثر و مفید باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشره میزبان

سوسک‌های برگخوار سیب‌زمینی در مرحله لاروی از مزارع آلوده سیب‌زمینی اردبیل و همدان جمع‌آوری شده و درون قوطی‌های درب‌دار پلاستیکی حاوی برگ سیب‌زمینی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. کلیه مراحل رشدی حشره در اتاق پرورش با دما ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز انجام گرفت. سوسک‌های بالغ بر روی گلدان سیب‌زمینی درون قفس نگهداری شدند. نوارهای حاوی تخم در ظروف بستنی با درب بدون منفذ همراه با پنبه مرطوب قرار داده شدند. شفیره در ظروف پلکسی‌گلس حاوی خاک اره استریل قرار گرفتند.

مبنای انتخاب جدایه‌ها، وجود ژن‌های مؤثر بر راسته سخت بالپوشان بر اساس تحقیقات قبلی (نظریان، ۱۳۸۶) در نظر گرفته شد. به این ترتیب دو جدایه YD5 (جدا شده از خاک یزد) دارای ژن‌های 3C -1I -18 -14 و جدایه 81 دارای ژن‌های 1I -26 -8B -8A -18 -7A و فرآورده تجاری (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*) Custom B.C به‌عنوان جدایه استاندارد، مورد بررسی قرار گرفتند. هر دو جدایه بومی دارای کریستال دو هرمی کروی و نامنظم بودند. برای تهیه غلظت‌های مختلف باکتری، کشت اولیه از نمونه‌های بومی باکتری لئوفیلیز شده در فریزر ۶۰- درجه سلسیوس صورت گرفت. بدین ترتیب بعد از کشت ۲۴ ساعته روی محیط N.A در دمای ۳۰ درجه، کلنی از روی محیط به‌وسیله لوپ استریل جمع‌آوری شده و به ارلن‌های حاوی محیط کشت Bloth L.B منتقل شدند (Sambrook *et al*., 1989). بعد از ۵ روز، محیط کشت حاوی اسپور-کریستال آزاد شده در لوله‌های استریل ریخته شده و بعد از قید نام ایزوله روی آن، در سانتریفوژ (دور ۳۰۰۰ با دمای ۳ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. مخلوط باکتری به ترتیب با ۲ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سانتریفوژ شد. نهایتاً اسپور-کریستال در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری همراه با ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و در فریزر با دمای ۱۳- درجه نگهداری شد (Bird and Akhurst, 2007).

دو جدایه بومی Bt روی محیط غذایی N.A (Nutrient Agar) کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی گرم، با میکروسکوپ فازکنتراست مورد بررسی قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت، تعداد کمی از باکتری‌ها، لیز شده و اسپور- کریستال خود را در داخل محیط کشت رها کردند و پس از ۹۶ ساعت تعداد اسپور و کریستال آزاد شده در محیط کشت افزایش یافت.

به منظور رنگ‌آمیزی گرم، ۵ میکرولیتر از محلول رقیق شده سوسپانسیون اسپور-کریستال، به ترتیب با کریستال ویوله و لوگول رنگ‌آمیزی و در نهایت با الکل اتانول ۹۶٪ آب‌گیری شد و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. در نهایت یک قطره سافرانین روی نمونه قرار داده و بعد از ۶۰ ثانیه، با آب مقطر شسته شد.

به منظور تهیه غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر) باکتری، ۲۰ میلی‌گرم از محلول استوک BSA (Bovin Serum Albumin) با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. به تعداد غلظت‌های مختلف BSA، ۱ میلی‌لیتر از معرف بردفورد ۲۰٪ را در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده و غلظت‌های تهیه شده بر روی آن ریخته شد. پس از کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفوتومتر، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور-کریستال همراه با ۱ میلی‌لیتر معرف بردفورد در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده شد.

به منظور شمارش اسپورهای باکتری‌ها، ابتدا سوسپانسیون رقیق شده از محلول استوک اسپور-کریستال تخلیص شده، تهیه گردید و ۷ میکرولیتر از آن برای شمارش اسپور استفاده شد. این آزمایش با سه بار تکرار انجام گرفت. به منظور شمارش تعداد اسپورهای زنده با قابلیت رشد و تندش از روش CFU (Colony Forming Unit) استفاده شد. به این منظور رقت‌های مختلف از محلول استوک اسپور-کریستال تهیه شده و از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت N.A ریخته شد. محیط کشت را در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده و تعداد کلنی‌ها پس از ۲۴ ساعت شمارش شد. غلظتی که در آن تعداد کلنی‌ها قابل شمارش باشد، به عنوان رقت مبنا برای شمارش کلنی هر ایزوله در نظر گرفته شد. برای این غلظت مبنا، ۳ تکرار در نظر گرفته شده و تعداد کلنی بعد از ۲۴ ساعت شمارش شده و با ضرب میانگین این ۳ شمارش در عکس رقت، تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر محلول استوک به‌دست آمد.

برای زیست‌سنجی و تعیین LC50، از غلظت‌های آماده شده استفاده گردید. ۵ غلظت از جدایه (Custom BC) کشت داده شده و برای هر غلظت ۲۰ ظرف پلاستیکی با قطر دهانه ۶ سانتی‌متری در نظر گرفته شد و ۳ تکرار زمانی نیز انجام پذیرفت. بدین ترتیب برای ۵ غلظت و شاهد ۳۱۵ ظرف تهیه و شماره‌گذاری گردید. در این زیست‌سنجی از روش غوطه‌وری برگ در سوسپانسیون اسپور-کریستال استفاده شد (Ferro and Gelenter, 1989). بدین ترتیب از برگ‌های تازه سیب‌زمینی دیسک‌هایی به قطر ۳ سانتی‌متر بریده و در غلظت‌های از پیش ساخته شده غوطه‌ور شد؛ به‌طوری‌که تمام سطح برگ آغشته به محلول گردد. سپس به منظور خشک شدن برگ‌ها، سی دقیقه در محیط استریل قرار گرفتند. پس از آن، درون هر ظرف یک دیسک برگی همراه با یک لارو سن دو قرار گرفت. ظروف زیست‌سنجی در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز قرار گرفتند. میزان مرگ و میر لاروها بعد از ۴ روز بررسی شد. آزمایش زیست‌سنجی ۳ بار تکرار گردید و اطلاعات بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

قدرت یک جدایه Bt بر اساس داده‌های حاصل از غلظت-مرگ و میر که به مقیاس لگاریتم-پروبیت تبدیل شده و مقایسه LC50 نمونه با LC50 استاندارد به‌دست می‌آید، لذا غلظتی که ۵۰ درصد جمعیت را تلف می‌کند جهت مقایسه کارایی و قدرت جدایه‌ها انتخاب شد (Lacey, 1997).

در جدایه استاندارد، غلظتی که ۵۰ درصد جمعیت لاروها را از بین برد، در تمامی جدایه‌ها با ۳ تکرار زمانی تست شده و آماربرداری از تلفات بعد از ۴ روز انجام گردید. میانگین درصد تلفات لاروهای سن ۲ سوسک کلرادوی سیب‌زمینی با استفاده از برنامه آماری MSTATC مورد ارزیابی قرار گرفت. انتخاب نمودن غلظت LC50 و مقایسه میانگین درصد تلفات جهت غربال‌گری جدایه‌ها از نظر وقت و هزینه روشی کاراتر می‌باشد. طبق آزمایشات مقدماتی مشاهده گردید که غلظت‌های رقیق‌تر از LC50 کشندگی مطلوبی نداشته و غلظت‌های بالاتر نیز معیار مناسبی برای سنجش کارایی جدایه‌ها نیستند لذا غلظتی از جدایه استاندارد که ۵۰ درصد جمعیت لاروها را از بین برده بود به‌عنوان مبنای مقایسه قرار گرفت.

نتایج

بررسی مقایسه‌ای واحدهای غلظت باکتری

مقدار پروتئین سنجیده شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، نمی‌تواند برآورد دقیقی از تعداد کریستال موجود در جدایه‌ها باشد، زیرا در این روش کلیه اجزای سلول باکتری که ماهیت پروتئینی دارند سنجیده می‌شوند. در مقابل شمارش تعداد کلنی تشکیل شده روی محیط کشت N.A می‌تواند نمایان‌گر تعداد اسپور زنده قابل تندش باشد و نسبت به روش‌های ذکر شده دارای دقت بیش‌تری می‌باشد.

جدول ۱- بررسی میزان اسپور، تعداد سلول و پروتئین جدایه‌های باکتری *B. thuringiensis*

Table 1. Protein, bacterial cell and spore abundance of *Bacillus thuringiensis*

شمارش اسپور در میلی‌لیتر (Spore/ml) Spores count in Milliliter	تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر(CFU/ml) Number of bacterial cells in Milliliter	پروتئین سنجیده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (µg/ml) Protein measured by Spectrophotometer	جدایه باکتری Isolated bacteria
3.7×10^9	4×10^{11}	4.61	CBC
5.8×10^9	1.7×10^2	1.30	YD5
3.01×10^9	5.6×10^{11}	0.19	81

با توجه به جدول ۱ هیچ نسبتی بین سه روش شمارش اسپور، شمارش کلنی و پروتئین‌سنجی وجود ندارد. بنابراین شمارش کلنی به عنوان واحد غلظت باکتری انتخاب و زیست‌سنجی انجام شد.

نتایج حاصل از زیست‌سنجی استاندارد

با استفاده از برنامه پروبیت، LC50 جدایه استاندارد به‌دست آمد. بدین ترتیب غلظتی که در آن ۵۰ درصد جمعیت لاروها از بین رفتند برابر با ۲۵۰۶/۶۳CFU/ml محاسبه گردید.

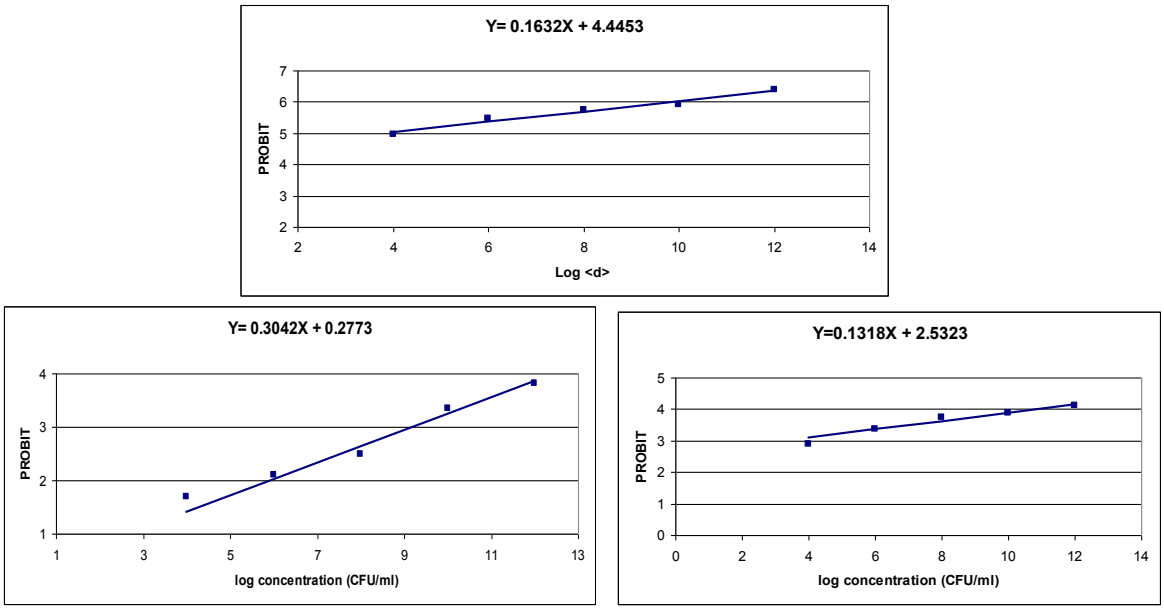
جدول ۲- نتیجه نهایی آزمایش زیست‌سنجی با لاروهای سن ۲ و جدایه Custom B.C

Table 2. Final result of bioassay by larvae and Custom BC

تعداد لارو تلف شده در اثر باکتری Bacterial killed larvae	تعداد لارو مورد آزمایش Number of the studied larvae	CFU/ml
29	58	4×10^3
41	60	4×10^5
46	57	4×10^7
49	60	4×10^9
55	60	4×10^{11}

محاسبات نرم‌افزار پروبیت

معادله خط line equation	Y = 0.1632 X + 4.4453
تعداد تکرار محاسبات replication number	3
ارزش کای اسکوایر X^2	1.1451
برآورد Log(LC50)	3.3991
برآورد LC50	2506.6257
خطای استاندارد Log(LC50) (Standard Error)	0.8287
محدوده ۹۵٪ اطمینان Log(LC50)	1.0354, 4.6829
محدوده ۹۵٪اطمینان LC50	10.8485, 48188.0894



نمودار ۱- نمودار پروبیت حاصل از زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه استاندارد (بالا)، جدایه YD5 (راست) و جدایه 81 (چپ).

Fig. 1. Probit figure for bioassay of neonates and standard isolate (up) and YD5 (right) and 81 (left).

نتایج مقایسه کارایی جدایه‌های بومی با جدایه استاندارد در غلظت‌های مختلف

آماربرداری از تلفات تیمارها در روز چهارم آزمایش انجام گردید. چون در شاهد تلفاتی مشاهده نشد نیازی به اصلاح تیمارها نبود. تجزیه آماری به صورت طرح کاملاً تصادفی CRD با استفاده از برنامه آماری MSTATC انجام گرفت و نشان داد که در سطح احتمال ۰/۰۱ تفاوت معنی‌داری بین جدایه استاندارد و دو جدایه بومی وجود دارد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که جدایه استاندارد در غلظت‌های مختلف ۶۲-۹۲٪ کشندگی بر روی لاروهای سوسک کلرادو داشته است؛ در حالی‌که در غلظت‌های پایین‌تر میزان کشندگی دو جدایه ایرانی حداکثر ۱۰ درصد برآورد گردید. در عوض در غلظت‌های بالاتر جدایه YD5 توانست تا ۵۹ درصد کشندگی در جمعیت لاورهای نئونات سوسک کلرادو ایجاد کند (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین درصد تلفات (X ± SEM) لاروهای سوسک کلرادو در اثر جدایه‌های بومی Bt و استاندارد

Table 3. Mean mortality percentage (X ± SEM) of Colorado leaf beetle larvae by native and standard isolates of Bt in different concentration

Mean mortality percentage			میانگین درصد تلفات		جدایه‌های مورد آزمایش
$CFU/ml10^{12}$	$CFU/ml10^{10}$	$CFU/ml10^{8}$	$CFU/ml10^{6}$	$CFU/ml10^{4}$	Studied isolates
92a±0.04	80a±0.02	73a±0.02	65a± 0.05	62a±0.06	Standard
59ab±0.02	22b±0.02	10b±0.01	5b	4b±0.01	YD5
34b±0.02	5b±0.01	0b±0.02	0b±0.02	0 b±0.01	81

نتایج مقایسه کارایی جدایه‌های بومی با جدایه استاندارد در دیگر غلظت‌ها

با توجه به مقایسه درصد تلفات حاصل از زیست‌سنجی جدایه‌های بومی با جدایه استاندارد در غلظت LC50 که در گراف پروبیت معادل با 10^4 CFU/ml می‌باشد (نمودار ۱)، می‌توان اذعان نمود طبق آزمون‌های انجام شده کارایی جدایه‌های بومی در حد معیارهای جدایه استاندارد نبوده و تلفات کافی روی لاروهای سن دوم سوسک کلرادو سیب‌زمینی ایجاد نکردند (نمودار ۱)، لذا سایر غلظت‌ها نیز مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. مقایسه درصد تلفات حاصل از زیست‌سنجی در غلظت‌های CFU/ml 10^{12}،10^{10}،10^8،10^6،10^4 در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مقایسات این نکته مشخص گردید که با افزایش غلظت، میزان کارایی جدایه‌های بومی نیز فزونی یافت. اگرچه جدایه‌های بومی در غلظت LC50 استاندارد، کارایی مطلوبی از خود نشان ندادند اما می‌توان با افزایش غلظت تلفات امیدبخشی را مشاهده کرد. همچنین بین دو جدایه مورد بررسی، جدایه ۸۱ کم‌ترین تلفات را در لاروهای سوسک کلرادو ایجاد کرد.

بحث

نتایج زیست‌سنجی جدایه‌های بومی با استفاده از دو واحد غلظت (CFU/ml Spore/ml) نشان داد انتخاب غلظت مناسب (حدود LC50) و مقایسه میانگین درصد تلفات در این غلظت جهت غربال‌گری جدایه‌ها روش مناسبی است اما زیست‌سنجی در غلظت‌های مختلف جهت تعیین جدایه‌های موثر وقت‌گیر و هزینه‌بر می‌باشد. در یکی از قدیمی‌ترین بررسی‌های انجام شده حساسیت سوسک برگخوار سیب‌زمینی نسبت به باکتری Bt بررسی گردید و وجود ß-endotoxin در ساختار باکتری عامل بیماری‌زایی در سوسک کلرادو شناسایی شد (Ignoffo *et al.,* 1982). با توجه به پروفیل ژنی وجود ۳ ژن موثر بر راسته سخت‌بالپوشان (cry 3, cry7, cry8) در جدایه بومی 81 مشهود است، اما عملکرد ضعیف این جدایه می‌تواند به دلیل غیرفعال بودن ژن‌ها یا میزان بیان کم ژن‌ها در این جدایه جمع‌آوری شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی باشد. همچنین از سوی دیگر هر دو جدایه بومی مورد استفاده در این تحقیق دارای کریستال دو هرمی بوده‌اند که بر اساس تحقیقات (Deist *et al.,* 2014) شکل و ساختار کریستال موجود در جدایه‌های باکتری Bt تأثیر مستقیمی بر کارکرد آن‌ها و خاصیت کشندگی آن‌ها به خصوص بر روی گروه‌های خاص حشرات دارد و می‌توان نوع ساختار کریستال را علتی بر مقاومت سوسک برگخوار سیب‌زمینی به دو جدایه بومی در نظر گرفت. از آن‌جا که اکثر مطالعات پیشین به بررسی میزان مرگ و میر لاروهای سن سوم و چهارم در اثر باکتری Bt پرداخته بودند، در این آزمایش سعی گردید میزان تأثیرگذاری این باکتری بر سنین پایین‌تر لاروی نیز مشخص گردد. برای مثال در مطالعه‌ای توسط Ghasemi-Kahrizeh and Aramideh (2015) مشخص گردید که بیش‌ترین مرگ و میر لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی در سنین بالای لاروی رخ داده و حتی اثر غیرمستقیم تیمار با باکتری در دوره شفیرگی طی تغذیه تدریجی از برگ‌های آلوده به دو ایزوله باکتری‌های *B. t. tenebrionis* و *B. t. kurstaki* نیز مشاهده می‌شود؛ همچنین Ghasemi-Kahrizeh and Aramideh (2014) نیز به بررسی میزان مرگ و میر لاروهای سنین سوم و چهارم سوسک برگخوار سیب‌زمینی بر اثر Bt پرداخته و نشان دادند در صورت استفاده تلفیقی از این باکتری به‌همراه عصاره حنا، بر شدت مرگ و میر لاروها با اثر سینرژیستی افزوده خواهد شد. در عین حال همین محققین بیان داشتند که علیرغم مشاهده بیش‌ترین میزان مرگ و میر در اثر ابتلا سنین سوم و چهارم لاروی، نمی‌توان اثر باکتری Bt بر روی مرگ و میر لاروهای سنین پایین‌تر را نادیده گرفت.

منابع References

اردبیلی، ژ. ۱۳۷۱. گزارش نهایی طرح بررسی و مقایسه اثر چند ماده حشره‌کش روی سوسک کلرادو در مزارع سیب‌زمینی اردبیل. گزارش پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی. ۸۰-۷۵.

اردبیلی، ژ، حیدری، ح. و بیات اسدی، ه. ۱۳۷۶. گزارش نهایی طرح مقایسه روش‌های مبارزه شیمیایی و غیرشیمیایی در کاهش جمعیت سوسک کلرادو و ارزیابی اقتصادی و زیست‌محیطی آن‌ها. گزارش پژوهشی طرح کاهش مصرف سموم کشاورزی، ۳۰ صفحه.

ایزدیار، س.، امیرصادقی، س.، بیات اسدی، ه.، سعیدی، ک. و عبائی، م.۱۳۷۶. جداسازی *B. thuringiensis* از لاروهای بیمار ابریشم بافناجور. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۲۵۶.

تاج‌بخش، ح. ۱۳۶۸. باکتری شناسی عمومی. انتشارات دانشگاه تهران.۲۹۲-۲۸۱.

توحیدی، ف.، ناظمی، ع. و خاتمی‌نژاد، م. ۱۳۹۰. جداسازی و شناسایی مولکولی ژن *cry* در باسیلوس تورینجینسیس‌های جدا شده از خاک‌های غرب مازندران. زیست فناوری میکروبی ۳(۱۱): ۱-۶.

خرم‌نژاد، آ.، طلایی حسنلوئی، ر. و قاسمی کهریزه، ا. ۱۳۹۴. مقایسه قدرت بیمارگری چند جدایه از باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌دست آمده از زیستگاه‌ها و میزبان‌های متفاوت روی بید کلم *Plutella xylostella*. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی ۴(۲): ۱۷۲-۱۶۷.

رنجی، ح.، مرزبان، ر. و همایونی فر، م. ۱۳۸۴. مقایسه تاثیر برخی حشره‌کش‌های شیمیایی و بیولوژیک در کنترل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی در مزارع سیب‌زمینی میاندوآب. دانش کشاورزی ۳ (۱۵): ۱۴۹-۱۴۳.

ریاضی، ا.، زرگری، ک. و کشاورزی، م. ۱۳۸۹. شناسایی انواع ژن‌های *cry1* در نمونه‌های *Bacillus thuringiensis* جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان و همدان. فصلنامه دانش زیستی ایران ۲(۲): ۱۹-۲۸.

فروزان، م.، نوری، ح.، رضایی، م. و حسن‌زاده، م. ۱۳۹۰. جداسازی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک باغات انگور شهرستان سلماس و ارزیابی سمیت آن بر روی لارو و حشرات کامل *Tribolium castaneum*. فصلنامه تحقیقات آفات گیاهی ۱(۱): ۶۶-۶۰.

قاسمی کهریزه، ا.، صفرعلیزاده، م.ح. و پورمیرزا، ع.ا. ۱۳۸۱. تأثیر باکتری *B. thuringiensis* Berliner روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae). خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه رازی کرمانشاه. صفحه ۱۹.

مرزبان، ر. ۱۳۷۶. کنترل بیولوژیکی شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* در خشکبار به‌وسیله باکتری *B. thuringiensis*. پایان نامه کارشناسی ارشد. حشره شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۲۰ صفحه.

نظریان، ا. ۱۳۸۶. غربال مولکولی ایزوله‌های بومی باکتری*B. thuringiensis* موثر بر راسته سخت‌بالپوشان بر اساس ژن‌های *cry* و *vip*. پایان نامه کارشناسی ارشد. حشره شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

Bird, L. J., and R. J. Akhurst. 2007. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *HelicoverpaPunctigera* (Wallengren) in Australia to two *B. thuringiensis* toxins. Journal of Invertebrate Pathology 94: 84-94.

Bernhard, K., Jarret, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Robert, G. M., Pauli, S., Rodgers, P. and Burges, H. D. 1997. Natural isolates of *B. thuringiensis*. World wide distribution, characterization and activity against insect pests. Journal of invertebrate Pathology 70: 59-68

Deist, B. R., Rausch, M. A., Fernandez-Luna, M. T., adang, M. J. and Bonning, B. C. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficiency. Toxins 6: 3005-3027.

Ferro, D. N. and Gelenter, W. D. 1989. Toxicity of a new strain of *B. thuringiensis* to Colorado potato beetle. Journal of Economic Entomology 82: 750-755.

Ghassemi-Kahrizeh, A. and Aramideh, S. 2015. Sub-lethal effects of *Bacillus thuringiensis* on larvae pf Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleopteran: Chrysomelidae). Archive of Phytopathology and Plant Protection 48(3): 259-267.

Ghassemi-Kahrizeh, A. and Aramideh, S. 2014. Study on the synergistic effect of Henna in enhancement of pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner on third and fourth instars larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Col.: Chrysomelidae). Archive of Phytopathology and Plant Protection 47(12): 1497-1507.

Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Kroha, M. 1982. Susceptibility of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* to *Bacillus thuringiensis.* Journal of Invertebrate Pathology 39(2): 244-246.

Lacey, L. A., 1997. Manual of techniques in insect pathology. Academic press, Sandiego, USA. 409 pp.

Marzban, R. 2002. Comparative bioassay of native isolates of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*on Indian meal moth *Plodia interpunctella.* Applied Entomology and Phytopathology 70(1): 83-90.

Meadows, M. R. 1993. *B. thuringiensis* in the Environ. Ecol and risk assessment. London. 350 pp.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, NY.

Say, T. 1823. Description of Coleopterous insects collected in late expedition to the Rocky mountains, performed by order to Mr. Calhourn, Secretary of War, under the command of Major Long. Journal of Academy of Natural Sciences of Philadelphia 3(2): 556-568.

Sneath, P. H. A. 1986. Endospore forming gram positive rods and cocci. Pp: 1104-1140. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. (eds.) Bergey's Manual of systematic bacteriology. G. Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.