بررسی تفاوت بیولوژیک دو جدایه ایرانی *Bacillus thuringiensis* از استان‌های کردستان و گلستان بر روی کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Study of biological differences between two native Iranian isolates of *Bacillus thuringiensis* from Kordestan and Golestan provinces on *Helicoverpa armigera* Hubner

سمانه خیری[۱]، محمدرضا رضاپناه[۲]، محمود شجاعی[۱]، غلامرضا صالحی جوزانی[۳] و ندا خردپیر[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۱۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۸/۲

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* متعلق به خانواده Bacillaceae یکی از مهم‌ترین دستاوردهای علم مبارزه بیولوژیک با آفات زیان‌آور از طریق کاربرد عوامل بیمارگر است که برای کنترل بسیاری از آفات متعلق به راسته‌های گوناگون جایگزین مناسبی برای مبارزه شیمیایی بوده است. پتانسیل‌های متفاوت این باکتری بر روی حشرات مختلف نه تنها ناشی از تنوع سروتایپ‌ها، بلکه تنوع سویه‌ها می‌باشد. کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae) آفت مهم پنبه کشور و سایر گیاهان زراعی نظیر توتون، گوجه‌فرنگی، ذرت، آفتابگردان، نخود، لوبیا و سویا می‌باشد. در راستای تحقق برنامه‌های کنترل بیولوژیک در قالب برنامه مدیریت تلفیقی آفات، ارزیابی کارایی جدایه‌های Bt در قالب آزمون‌های دقیق زیست‌سنجی موضوع اصلی این مقاله می‌باشد. به این منظور دو جدایه بومی متعلق به استان‌های کردستان (KON1) و گلستان (۹۰) در مقایسه با جدایه تجاری و استاندارد Dipel مورد بررسی قرار گرفتند. LC50 برای جدایه Dipel، ۶۸/۲۸۶۴ اسپور بر هر میلی‌لیتر، برای جدایه ۹۰، ۵۹×۱۰^{۹} اسپور بر هر میلی‌لیتر و برای جدایه KON1، ۸۴×۱۰^{۱۳} اسپور بر هر میلی‌لیتر نشان‌دهنده میزان کارائی این ایزوله‌ها بود. مرگ و میر لاروها در غلظت‌های متفاوت دو ایزوله بومی باکتری نشان‌دهنده نوعی مقاومت نسبی به این دو جدایه در مقایسه با جدایه تجاری Dipel بود.

واژگان کلیدی: باکتری *Bacillus thuringinesis*، جدایه ۹۰، گلستان، جدایه KON1، کردستان، زیست‌سنجی

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه حشره‌شناسی، تهران، ایران

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

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

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

نویسنده مسئول مکاتبات:n.kheradpir@iauvaramin.ac.ir

مقدمه

ایجاد نسل مقاوم به سموم در میان جمعیت آفات، همچنین مسئله باقیمانده سموم و اثرات مخرب زیست‌محیطی، ایجاد آفات ثانویه و از بین رفتن دشمن طبیعی از معضلات جدی استفاده سموم محسوب می‌شود. در چنین شرایطی روش‌های متعددی به منظور مدیریت اکولوژیک جمعیت آفات مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت روش کنترل تلفیقی آفات بر مبنای روش‌های غیرمخرب با هدف حفظ سلامت محصول و حداقل اثرات سوء و کنترل پایدار آفات برگزیده شد. کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های مهم کنترل آفات در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی است. *Bacillus thuringiensis* اولین بار توسط Berliner از شب پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* Zeller توصیف شد. علت انتخاب این نام برای باکتری، نمونه‌های آلوده جمع‌آوری شده از آسیابی در ایالت Thuringia در آلمان بود. اگرچه اولین توصیف تحت عنوان نام *B. thuringiensis* توسط Berliner انجام شد، اما نمی‌توان آن را اولین جمع‌آوری به حساب آورد (Ishiwata, 1901)

اولین مصرف مزرعه‌ای Bt جهت کنترل کرم ساقه‌خوار ذرت *Ostrinia nubilalis* Hubner گزارش شد (Husz, 1929). تولید اولین فرآورده تجارتی به نام Sporine در فرانسه (۱۹۳۸) انجام گرفت (Lambert and Peterson, 1992). وجود کریستال (Parasporal body) در مرحله اسپورزایی اعلام شد (Berliner, 1915 به نقل از van Frankenhuyzen, 1993). Hannay (1953) ثابت نمود که همزمان با تشکیل اسپور درون سلول باکتری اجسام بلورین (کریستال) نیز به وجود می‌آید که این کریستال در محلول قلیایی رقیق قابل حل بوده اما در مواد غیرآلی غیرمحلول است.

Dulmage and Martinez (1973) اولین افرادی بودند که مجموعه‌ای از استرین‌های Bt را جمع‌آوری کرده و پیشرفت تحقیقات بر روی شناسایی سویه‌های مختلف باکتری Bt را سبب شدند. در این راستا استرین HD-1 به عنوان سویه استاندارد در مطالعات Bt استفاده می‌شود، جداسازی گردید (Nakamura and Dulmage, 1988). در ابتدا تعداد جدایه‌های باکتری در حدود ۴۰.۰۰۰ جدایه در دنیا تخمین زده شد (Lambert and Peterson, 1992)، اما به تدریج این مقدار به ۶۰.۰۰۰ عدد تغییر داده شد (Boucias and Pendland, 1998). علاوه بر استرین‌های مؤثر علیه بالپولکداران، دوبالان و سخت‌بالپوشان، استرین‌های مؤثر علیه بال غشاییان، جوربالان، شپش‌ها، نماتدها و پروتوزواها نیز کشف شدند (Rajamohan *et al*., 1998).

از ایران نیز مطالعات متعددی بر روی میزان تأثیر مواد بیولوژیک بر اساس Bt با نام‌های تجاری مختلفی بر روی آفات گوناگون انجام شده اند. از جمله کارهای انجام شده می‌توان به بررسی‌های صفرعلیزاده (۱۳۵۵) بر روی آفات بلوط، دانیالی و ایزدیار (۱۳۶۹) بر روی آفات برگخوار سویا و کرم قوزه پنبه، جوان‌مقدم و حیدری (۱۳۷۴) بر روی کرم ابریشم‌باف ناجور اشاره کرد. در آذربایجان غربی تأثیر Bt بر روی لیسه سیب مورد بررسی قرار گرفت و نتایج قابل قبولی در حد تأثیر حشره‌کش‌های شیمیایی متداول در منطقه به دست آمد (خلیل آریا و همکاران، ۱۳۷۷). مشهدی جعفرلو (۱۳۷۵) تأثیر Bt را بر روی لیسه سیب در آذربایجان شرقی بررسی و نتایج مطلوبی به‌دست آورد. مرزبان (۱۳۷۶) کنترل بیولوژیکی شب‌پره هندی در خشکبار به‌وسیله باکتری Bt را مورد بررسی قرار داد. ایزدیار (۱۳۸۱) دوازده جدایه بومی Bt بر روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتااگزوتوکسین در آن‌ها را مورد مطالعه قرار داد. کریمی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی توانایی *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* بر علیه شب پره تک نقطه‌ای و کرم ساقه‌خوار برنج پرداختند.

با توجه به سطح زیر کشت پنبه و همچنین گوجه‌فرنگی و سایر گیاهان خانواده Solanaceae و اهمیت اقتصادی این محصولات استفاده از Bt می‌تواند راهکار مناسبی به منظور کنترل تلفیقی آفات پنبه به خصوص کرم قوزه پنبه به‌شمار آید. هدف از این تحقیق ارزیابی سوش‌های بومی Bt جمع‌آوری شده از استان‌های کردستان و گلستان بر روی کرم قوزه پنبه می‌باشد. داده‌هایی که از این پروژه به‌دست می‌آید، علاوه بر تعیین کارایی این ایزوله‌ها در کاهش جمعیت آفت هدف، می‌تواند در ارتباط با مطالعات مولکولی راهگشا باشد؛ تا بتوان بر اساس مارکرها یا نشان‌گرهای مولکولی، پتانسیل و کارایی جدایه‌ها را تا حدودی تخمین زد. ایزوله‌های بومی مورد نظر در این طرح در ایران و سایر

نقاط جهان تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. با توجه به روند روبه رشد استفاده از سموم میکروبی در کنترل آفات، اطلاعات در مورد ارزیابی اثر کشندگی ایزوله‌های بومی بر روی آفت مورد نظر مفید خواهد بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشره میزبان

جمع‌آوری کرم قوزه در ۲ مرحله از مزارع گوجه‌فرنگی واقع در گرگان انجام گرفت. لاروها از گوجه‌های آلوده جداسازی و درون قوطی فیلم حاوی غذای مصنوعی به آزمایشگاه منتقل شدند. شفیره‌ها نیز به ظروف حاوی خاک اره استریل انتقال داده شد.کلیه مراحل رشدی آفت در اتاق پرورش با دما ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز انجام گرفت. برای پرورش کرم قوزه پنبه، غذای مصنوعی از مواد غذایی و مواد نگهدارنده قابل دسترس به شرح زیر تهیه گردید: لوبیا چشم بلبلی (خیسانده شده در آب به مدت ۲۴ ساعت)، مخمر نانوایی (۳۵ گرم)، پودر جوانه گندم (۳۰ گرم)، اسید سوربیک (۱/۱ گرم)، اسید اسکوربیک (ویتامینC) (۳/۵ گرم)، متیل پاراهیدروکسی بنزوات (نیپاژین) (۲/۲ گرم)، آگار- آگار (۱۴ گرم)، روغن آفتابگردان (بدون آنتی‌اکسیدانت) (۵ میلی‌لیتر) و فرمالدئید ۳۷٪ (۲/۵ میلی‌لیتر).

ابتدا آگار-اگار در ارلن حاوی ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و در اتوکلاو با دما ۱۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. لوبیا چشم بلبلی خیسانده شده در آب بعد از ۲۴ ساعت به همراه مخمر، پودر جوانه گندم، اسید سوربیک، روغن، فرمالدئید در مخلوط‌کن با یکدیگر آمیخته شده و نیپاژین به ارلن حاوی محلول آگار-آگار اضافه شد. سپس محتوای ارلن به مدت ۱ دقیقه با سرعت بالا با محتویات مخلوط‌کن آمیخته شد. بعد از این‌که دمای مخلوط به ۵۵ درجه سلسیوس رسید، اسید اسکوربیک اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه بهم زده شد. مواد غذایی زیر هود در پتری‌های استریل به قطر ۱۵ سانتی‌متر ریخته و تا زمان تغذیه حشرات در یخچال نگهداری شدند.

شب پره‌ها در دسته‌های ۱۰ تایی (۵ نر + ۵ ماده) در استوانه‌های پلاستیکی ۳۵×۱۷cm با دیواره پوشیده با کاغذ جذب کننده رطوبت قرار داده شدند. پتری حاوی آب-عسل ۱۰٪ به منظور تغذیه افراد بالغ درون استوانه‌ها در نظر گرفته شد. نوارهای حاوی تخم کرم قوزه در ظروف بستنی با درب بدون منفذ همراه با یک قطعه پنبه مرطوب قرار داده شدند. پس از تفریخ تخم‌ها، لاروهای نئونات با قلم موی ظریف بصورت دسته‌های ۷۰-۶۰ تایی در ظروف بستنی با درب محکم قرار گرفتند. لاروها بعد از گذشت ۴ روز به‌صورت انفرادی درون قوطی فیلم حاوی غذای مصنوعی قرار داده شدند. درب قوطی با توری ظریف پوشانده شد.

تعیین ایزوله‌های باکتری Bt مورد آزمایش

در این آزمایش مبنای انتخاب جدایه‌ها، وجود ژن‌های مؤثر بر راسته بالپولکداران (cry 1) بر اساس تحقیقات انجام شده قبلی (سیفی‌نژاد، ۱۳۸۶) بود. به این ترتیب جدایه‌های۹۰ (سویه بومی استان گلستان)، KON1 (سویه بومی استان کردستان) و فرآورده تجاری Dipel (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) به عنوان جدایه استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند. 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. (Nutrient Agar) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی از روی محیط بوسیله لوپ استریل جمع‌آوری و به ارلن‌های حاوی محیط کشت L.B منتقل شدند (Sambrook *et al*., 1989). ارلن در شیکر با دور ۱۶۰rpm قرار گرفته و سپس در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس گذاشته شد. بعد از گذشت ۵ روز، محیط کشت حاوی اسپور-کریستال آزاد شده در لوله‌های استریل ریخته شده و بعد از قید نام ایزوله بر روی آن، در سانتریفوژ (دور ۳۰۰۰ با دمای ۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. مایع رویی جداسازی شه و باقیمانده با ۲ میلی‌لیتر کلریدسدیم ۰/۱ مولار مخلوط شد و مجدداً با دور ۳۰۰۰ با دمای ۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی جداسازی شده و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به لوله اضافه و سانتریفوژ شد.

نهایتاً اسپور-کریستال ته نشست در انتهای لوله با سمپلر استخراج و در ویال ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با ۰/۲ میلی‌لیترآب مقطر استریل کاملاً مخلوط و در فریزر ۱۳- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (Bird and Akhurst, 2007). به منظور تهیه غلظت‌ها، ابتدا ۵ لوله آزمایش استریل برای هر سویه شماره‌گذاری (۱ تا ۵) شد. در لوله اول ۹ میلی-لیتر آب مقطر استریل ریخته و ۱ میلی‌لیتر از استوک اسپور-کریستال به آن اضافه گردید و سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. در لوله دوم ۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لوله اول به آن اضافه گردید. در لوله‌های بعدی نیز به همین منوال ۹/۹ ml آب مقطر استریل ریخته و در هر لوله ۰/۱ ml از سوسپانسیون لوله قبل اضافه شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر

به جهت تهیه غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر) باکتری،۲۰ میلی‌گرم از محلول استوک BSA (Bovin Serum Albumin) با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به تعداد غلظت‌های مختلف BSA، ۱ میلی‌لیتر از معرف بردفورد ۲۰٪ در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و بر روی آن از غلظت‌های تهیه شده 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 خالص، تهیه گردید و ۷ میکرولیتر از آن برای شمارش اسپور استفاده شد. این آزمایش در سه 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 و از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت N.A ریخته شد. محیط کشت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و تعداد کلنی‌ها پس از ۲۴ ساعت شمارش شدند. غلظتی که در آن تعداد کلنی‌ها قابل شمارش باشد، به عنوان رقت مبنا برای شمارش کلنی هر ایزوله در نظر گرفته شد. برای غلظت مبنا، ۳ تکرار در نظر گرفته و تعداد کلنی بعد از ۲۴ ساعت شمارش شده و با ضرب میانگین سه تکرار در معکوس رقت، تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر محلول استوک به‌دست آمد. جدایه‌های بومی Bt روی محیط غذایی N.A 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 فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفت.

کلنی‌های باکتری در ۲۴ ساعت اول روی محیط کشت نوترینت‌آگار ظاهر و در این فاصله زمانی اسپورها جوانه زده و باکتری‌هایی که در مرحله رویشی بودند تکثیر یافتند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، اسپور در داخل سلول رویشی اکثر باکتری‌ها تشکیل و به وضوح دیده شد. اسپورها به صورت نیمه انتهایی درون باکتری جای داشتند. بعد از ۷۲ ساعت، تعداد کمی از باکتری‌ها لیز شده و اسپور- کریستال خود را درون محیط کشت رها کردند و پس از ۹۶ ساعت تعداد اسپور و کریستال آزاد شده در محیط کشت افزایش یافت. جهت رنگ‌آمیزی گرم، ۵ میکرولیتر از محلول رقیق شده سوسپانسیون اسپور-کریستال، بر روی لامل قرار داده و بعد از تثبیت قطره با حرارت، نمونه به ترتیب با یک قطره کریستال ویوله، یک قطره لوگول و یک قطره سافرانین به مدت ۶۰ ثانیه رنگ‌آمیزی گردید و سپس با آب مقطر شسته شد.

زیست‌سنجی جدایه‌های بومی Bt بر روی کرم قوزه پنبه

برای زیست‌سنجی و تعیین LC50، از غلظت‌های آماده شده استفاده گردید. ۵ غلظت از هر جدایه و برای هر غلظت ۲۵ قوطی فیلم در ۳ تکرار زمانی در نظر گرفته شد. زیست‌سنجی از طریق روش آمیختن باکتری با غذای مصنوعی انجام گرفت (Bird and Akhurst, 2007؛ Dulmage *et al.*, 1971). از هر غلظت باکتری تهیه شده ۶/۶ میلی‌لیتر به ۵۰ میلی‌لیتر غذای مصنوعی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس اضافه و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۲

میلی‌لیتر غذای مصنوعی حاوی اسپور و کریستال در قوطی فیلم ریخته شد. بافت غذا طی مدت زمان ۳۰ دقیقه کاملاً می بندد. یک لارو نئونات فعال با سن کم‌تر از ۱۲ ساعت، با استفاده از قلم موی استریل به هر قوطی منتقل شد. برای تیمار شاهد ۶/۶ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ۵۰ میلی‌لیتر غذای مصنوعی اضافه شد.

ظروف زیست‌سنجی در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶:۸ قرار گرفتند. میزان مرگ و میر لاروها بعد از ۷ روز بررسی شد. معیار مرگ و میر در اثر باکتری، سیاه شدن و عدم واکنش به ضربه سوزن بود. مرجع استاندارد زیست‌سنجی در مورد راسته بالپولکداران برای فرآورده‌های باکتریایی در اکثر کشورهای جهان و خصوصاً آمریکا *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* می‌باشد که در این آزمایشات نیز از همین باکتری به عنوان فرآورده تجاری دایپل ساخت کشور هلند استفاده گردید. داده‌های حاصل به‌وسیله نرم‌افزار Probit مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقدار LC50 ارزیابی و شاخص‌های آماری مربوط مشخص گردید.

نتایج

در جدول ۱ برآورد تعداد اسپور در ایزوله‌های مختلف باکتری حاصل از مزارع دو شهرستان کردستان و گلستان به همراه ایزوله شاهد ارائه شده است. ارزیابی بیولوژیک جدایه‌های باکتری Bt به صورت زیست‌سنجی با روش LC50 بر روی لاروهای نئونات کرم قوزه پنبه صلاحیت و حساسیت لازم برای این امر را دارا بود. در جدول ۲، نتایج محاسبات نرم‌افزار پروبیت شامل شاخص‌های پروبیت: معادله خط، برآورد LC5، محدوده اطمینان و معیار آزمون مربع لاتین (x^2) ارائه شده است. معیار آزمون مربع لاتین (x^2) شاخص رد یا قبول فرضیه برازش (فیت بودن) نقاط با خطوط است. لذا تمامی خطوط پروبیت در سطح احتمال ۱٪ با نقاط مشاهده شده برازش دارند.

جدول ۱- نتایج نهایی آزمایش زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه‌های Dipel، 90 و (KON1)

Table 1. Final result of bioassay with neonates, two Bt native isolates of 90 and KON1 and Dipel as control

Dipel (شاهد)		KON1		90		تعداد لارو مورد آزمایش Number of studied larvae
تعداد لارو باکتریایی تلف شده Number of killed bacterial larvae	اسپور در هر غلظت Spores abundance in each concentration	تعداد لارو باکتریایی تلف شده Number of killed bacterial larvae	اسپور در هر غلظت Spores abundance in each concentration	تعداد لارو باکتریایی تلف شده Number of killed bacterial larvae	اسپور در هر غلظت Spores abundance in each concentration	
34	1.7×10^1	5	2.8×10^1	8	3.6×10^1	75
44	1.7×10^3	8	2.8×10^3	10	3.6×10^3	75
56	1.7×10^5	10	2.8×10^5	12	3.6×10^5	75
61	1.7×10^7	10	2.8×10^7	16	3.6×10^7	75
67	1.7×10^9	23	2.8×10^9	38	3.6×10^9	75

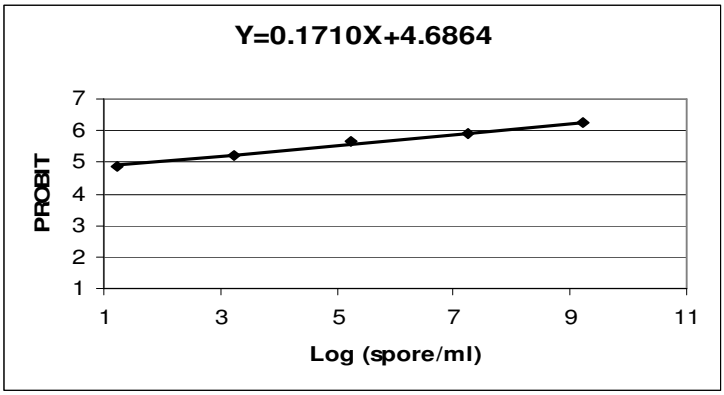
جدول ۲- نتیجه محاسبات نرم‌افزار پروبیت:

Table 2. Final results of Probit software assessments

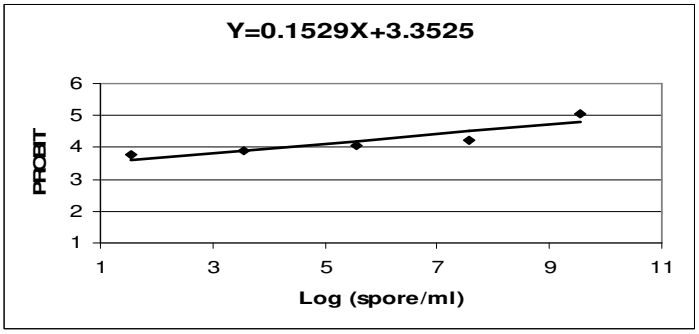
جدایه	KON1	90	Dipel
Probit Line equation معادله خط پروبیت	Y = 0.1137 X + 3.3020	Y = 0.1529 X + 3.3525	Y =0.1710 X + 4.6864
replication تعداد تکرار	4	5	3
X^2	2.4943	7.0344	0.3475
Log(LC50)	14.9285	10.7732	1.8343
LC50	848291439810000	593223311430	68.2864
Log(LC50) Standard Error of Log (LC50) خطای استاندارد	2.3655	0.9515	0.6041

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تراکم اسپورهای باکتری در هر دو جدایه بومی در مقایسه با جدایه باکتری شاهد در سطح نسبتاً بالاتری قرار داشته و در عین حال نتایج حاصل از مرگ و میر لاروها با استفاده از

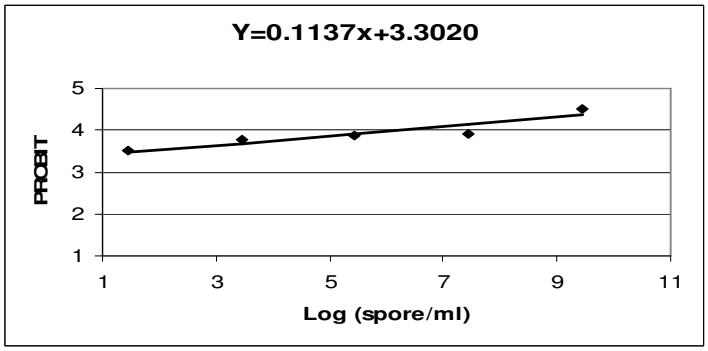
جدایه‌های بومی در مقایسه با راندمان تلفات فرمولاسیون تجاری Dipel بسیار کم است. که همین امر می‌تواند نشان‌دهنده عدم کارآیی نسبی جدایه‌های بومی در مقایسه با جدایه تجاری شاهد باشد. شکل‌های۱ و ۲ و ۳ نیز خطوط احتمال و نقاط مربوط به زیست‌سنجی جدایه‌های بومی و تجاری را بر روی لاروهای نئونات به ترتیب نشان می‌دهند.



شکل ۱- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه استاندارد Dipel
Fig. 1. Bioassay with neonates and Dipel



شکل ۲- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه ایرانی ۹۰
Fig. 2. Bioassay with neonates and native isolate 90



شکل ۳- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه ایرانی KON1
Fig. 3. Bioassay with neonates and native isolate KON1

به‌این ترتیب غلظتی از باکتری Bt که ۵۰٪ جمعیت لاروهای نئونات کرم قوزه پنبه را تلف کرد (LC50) ۷ روز پس از آغاز زیست‌سنجی‌ها ارزیابی شد. LC50 برای جدایه Dipel، ۱۱/۷۷۹۰ اسپور در هر میلی‌لیتر (در محدوده ۱/۵۶۱۸ تا ۲/۴۵۱۷ در سطح اطمینان ۹۵٪)، برای جدایه ۹۰، ۵۹×۱۰^{۹} اسپور در هر میلی‌لیتر (در محدوده ۲۰×۱۰^{۸} تا ۲۹×۱۰^{۱۲} در سطح اطمینان ۹۵٪) و برای جدایه KON1، ۸۴×۱۰^{۱۳} اسپور در هر میلی‌لیتر (در محدوده ۵۸×۱۰^{۱۰} تا ۱۰×۱۰^{۱۶} در سطح اطمینان ۹۵٪) نشان‌دهنده میزان کارائی این ایزوله‌ها بود. در تعیین و مقایسه میزان کارائی باکتری‌ها در آزمون‌های زیست‌سنجی، استاندارد کردن روش، غلظت‌های استفاده شده، نوع غذا، وزن لاروها و استرین ژنتیکی اهمیت به سزائی دارد.

بحث

یکی از روش‌های مورد استفاده برای غربال کردن میکروارگانیسم‌ها و تعیین بیماری‌زایی آن‌ها، زیست‌سنجی است. در حقیقت زیست‌سنجی روشی است که برای تعیین اثرات بیولوژیکی عوامل کنترل‌کننده 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. روش‌های زیست‌سنجی نه تنها در مورد ترکیبات شیمیایی سنتزی بلکه برای آزمایش مواد بیولوژیکی که خاصیت آفت‌کشی دارند نیز مورد استفاده است. برای نمونه در مورد باکتری Bt به علت زیاد بودن تعداد جدایه‌های اولیه، زیست‌سنجی روشی مناسب برای مشخص کردن جدایه‌های فعال است. در این روش پارامترهای شناخته شده‌ای نظیر LD50 و LC50 اندازه‌گیری می‌شود که مؤید بیماری‌زایی Bt و در نهایت مرگ و میر موجود هدف تحت شرایط آزمایش است. یک اصل مهم برای سنجش خاصیت سمی و نیز بیماری‌زایی پاتوژن‌های حشرات آن است که می‌بایست این آزمایشات بر روی موجود مناسب و حساس انجام گیرد. جدایه‌های مختلف Bt اثرات متفاوتی بر روی میزبان‌های مورد آزمایش به‌جا می‌گذارند، این اثرات حاصل تفاوت محیط‌های اکولوژیکی مختلف می‌باشد. لذا زیست‌سنجی در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی ابزار مفیدی است که می‌تواند گونه‌های حساس به هر جدایه را مشخص کرده و ویژگی انتخابی هر جدایه را از نظر میزبان معلوم کند. در این بررسی دو جدایه حاصل از خاک‌های زراعی استان‌های گلستان و کردستان برای آزمایش زیست‌سنجی بر روی کرم قوزه پنبه انتخاب شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در ارتباط با تعداد لاروهای کشته شده نسبت به تراکم اسپورهای موجود در هر جدایه بومی و مقایسه آن‌ها با سطح کشندگی جدایه Dipel می‌توان نتیجه گرفت که دو جدایه بومی از کارایی نسبی پایینی در مقایسه با نمونه شاهد قرار داشته و همچنین مقدار LC50 برای کرم قوزه پنبه در این جدایه‌ها رضایتبخش نبود. در مطالعات مشابه توسط Hosseinzadeh and Aramideh (2016) مقدار LC50 باکتری Bt بر روی *Spodoptera exigua* Hubner اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل نشان داد که میزان مرگ و میر لاروها در سنین مختلف در صورت ترکب دو جدایه باکتری با یکدیگر یا ترکیب با فرمولاسیون اسپینوزاد به سطح مطلوب خود می‌رسد و استفاده از جدایه‌های باکتری به تنهایی مؤثر نخواهد بود. (Shishir *et al.*, 2012) طی بررسی خود بر روی ۵۷ جدایه Bt که از سه نوع زیستگاه مختلف در بنگلادش جداسازی شده بودند دریافتند که پنج نوع پروتئین مختلف در این سویه‌ها با غلظت‌های گوناگون مشاهده می‌شود که همین تنوع بر کارایی نهایی هر جدایه در کنترل جمعیت آفت هدف تأثیر خواهد گذاشت. می‌توان مقادیر بسیار بالای LC50 را نشان‌دهنده مقاومت نسبی حشره هدف نسبت به جدایه باکتری مورد استفاده نیز در نظر گرفت. طی مطالعه جدایه‌های باکتری Bt جمع‌آوری شده از غرب آفریقا، مشخص گردید که *Helicoverpa armigera* تقریباً نسبت به تمامی جدایه‌ها مقاومت داشت (Brevaldt *et al.*, 2009). (Avilla *et al.*, 2005) طی بررسی جدایه‌های بومی اسپانیا برروی جمعیت کرم قوزه دو سویه واجد توکسین‌های Cry1Ac4 و Cry2Aa1 را با LC50 معادل ۳/۵ و ۶/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان مؤثرترین جدایه‌های بومی آن کشور معرفی کردند. در مطالعه دیگری بر روی زیست‌سنجی پنج جدایه از باکتری Bt بر روی *Spodoptera frugiperda* مشخص گردید که تنها دو سویه *Bt aizawai* HD68 و *Bt thuringiensis* 4412 به ترتیب

با ۱۰۰٪ و ۸۴٪ تلفات لاروهای سن دوم از سایر سویه‌ها موفق‌تر بودند. همچنین مقدار LC50 برای این دو سویه به ترتیب $۶/۷ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر محلول و $۸/۶ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر محاسبه گردید (Polanczyk *et al.,* 2000) که در مقایسه با سویه‌های بومی مورد استفاده در این تحقیق از موفقیت بالاتری در کنترل جمعیت لاروهای *S. friguperda* برخوردار بوده‌اند. جدایه‌های گلستان و کردستان پتانسیل قابل قبولی برای کنترل کرم قوزه پنبه در مقایسه با جدایه استاندارد Dipel و نتایج حاصل از تحقیقات مشابه ارائه ننموده و لذا در اجرای برنامه‌های مدیریت این آفت از اولویت چندانی برخوردار نیستند. در عین حال می توان به این جدایه‌ها در غلظت‌های بسیار بالا در کنار سایر روش‌های کنترل بیولوژیک امیدوار بود.

منابع References

ایزدیار، س. ۱۳۸۱. زیست‌سنجی جدایه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتااگزوتوکسین در آن‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۱۷ صفحه.

جوانمقدم، ه. ۱۳۷۴. مقایسه تأثیر دو حشره‌کش *Bacillus thuringiensis* روی پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

خلیل‌آریا، ع.، دانیالی، م. و مستعان، م. ۱۳۷۷. کنترل لیسه سیب با *Bacillus thuringiensis* و مقایسه آن با سم فسفره زولن. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۱۲۵.

دانیالی، م. و ایزدیار، س. ۱۳۶۹. بررسی تاثیر سموم میکربی در کنترل کرم قوزه پنبه، گزارش پژوهشی بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.

سیفی‌نژاد، ع. ۱۳۸۶. غربال مولکولی ایزوله‌های بومی باکتری*B. thuringiensis* موثر بر راسته بالپولکداران بر اساس ژن‌های *cry* و *vip*. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تهران. ۱۰۹ صفحه.

صفر علیزاده، م. ح. ۱۳۵۵. بررسی اثر بیماری‌زایی *Bacillus thuringiensis* روی لارو برگ‌خوار بلوط. نشریه آفات و بیماری‌های گیاهی ۴۳ :۶۳-۵۸.

کریمی، ج.، حسن‌شاهی، م.، عباسی‌پور، ح.، نصیری‌مقدم، م. و طالعی، د. ۱۳۹۱. بررسی توانایی باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* علیه شب پره تک نقطه‌ای و کرم ساقه‌خوار برنج. پانزدهمین همایش ملی برنج کشور.

مرزبان، ر. ۱۳۷۶. کنترل بیولوژیکی شب‌پره هندی *Podia interpunctella* در خشکبار به‌وسیله باکتری *Bacillus thuringiensis*. پایان نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۲۰ صفحه.

Avilla, C., Vargas-Osuna, E., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J. and Gonzalez-Zamora, J. E. 2005. Toxicity of several endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* from Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 51-54.

Berliner, E. 1915. Uber die schlaffsucht der Mehlmotlenroupe *Ephestia Kuehniella* Zell. Und -ihren erreger *Bacillus thurigiensis* nsp., Z. Angew Entomology 2, 29-56 (cited in the safety of microbial insecticides Pp. 36-39).

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

Brevaldt, T., Prudent, P., Vaissayre, M., and Carriere, Y. 2009. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac and Cry2Ab2 insecticidal proteins in four countries of the west African cotton belt. Journal of Economic Entomology 102(6): 2301-2309.

Boucias, D. G. and Pendland, J. C. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.

Dulmage, H. T., Boening, O. P., Rehnborg, C. S. and Hansen, G. D. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. Journal of Invertebrate Pathology 18: 240–245.

Dulmage, H. T. and Martinez, E. 1973. The effects of two continuous exposures to low concentrations of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. Journal of Invertebrate Pathology 22:14-22.

van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis* and environmental biopesticide: Theory and practice. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Baily, M. J. and Higgs, S. (eds.), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.

Hannay, C. L. 1953. Crystalline inclusion in aerobic spore-forming bacteria. Nature 172:1004.

Hosseinzadeh, A. and Aramideh, S. 2016. Toxicity of *Bacillus thuringinesis* var. *kurstaki* and Spinosad on three larval stages of beet armyworm *Spodoptera exigua.* Journal of Entomology and Zoology Studies 4(5): 375-379.

Husz, B. 1929. On the use of *B. thuringiensis* in the fight against the corn borer. Science 2: 99- 110.

Lambert, B. and Peterson, M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. Bioscience 42: 112-122.

Nakamura, L. K. and Dulmage, H. T. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the US Department of Agriculture. Technical Bulletin of USDA, 38p.

Polanczyk, R. A., de Silva, R. F. P. and Finza, L. M. 2000. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda.* Brasilian Journal of Microbiology 31: 165-167.

Rajamohan. F., Lee, M. K. and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action Prog. Nucleic Acid Research in Molecular Biology 60: 1-27.

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

Shishir, A., Aketr, A., Hassan, H., Kibria, G., Ilias, M., Nargis Khan, S. and Hoq, M. 2012. Characterization of locally isolated *Bacillus thuringiensis* for the development of eco-friendly biopesticides in Bangladesh. Journal of Biopesticides 5: 216-222.