شناسایی انواع ژن های cry1 در نمونه های باسیلوس تورنجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان و همدان

الهام ریاضی [*۱]، کاوه زرگری [۲]، منصوره کشاورزی [۳]

۱. کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۲. استادیار رشتهٔ اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا، ورامین، ایران.
۳. استادیار بخش باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، کرج، ایران.

مکان انجام تحقیق: آزمایشگاه بیوتکنولوژی، مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

***مسؤول مکاتبات:** الهام ریاضی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، پست الکترونیکی: elhamriazi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۱۶

چکیده

امروزه به دلیل استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و تاثیر سوء آن‌ها بر محیط زیست و سلامتی انسان، توجه دانشمندان و محققان به روش‌های کنترل بیولوژیک معطوف شده است. یکی از میکروارگانیسم‌های کاربردی در این زمینه *Bacillus thuringiensis* است که از لحاظ مقدار و وسعت کاربرد، در مقام اول قرار دارد. در این راستا، برای شناسایی سویه‌های موثر بر آفات راسته بال پولک داران، ۵۰ سویه بومی *Bacillus thuringiensis* جمع‌آوری شده از مزارع استان‌های خراسان و همدان، مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی سویه‌ها بر اساس تکنیک PCR با استفاده از ۱۴ پرایمر اختصاصی برای ژن‌های cry1a، cry1b، cry1c، cry1d، cry1e، cry1f و cry1g صورت گرفت. ژن‌های cry1 پروتئین‌های فعال علیه آفات راسته بال پولک‌داران را کد می‌کنند. از جمله آفات مهم این راسته می‌توان به مینوز برگ غلات و کرم ساقه خوار گندم اشاره کرد. بررسی باندهای به دست آمده و مقایسه آن‌ها با سویه‌های شاهد نشان داد که فراوانی ژن‌های مورد نظر در سویه‌های مختلف، بسیار متفاوت است، به طوری که بعضی از ژن‌ها مانند cry1a به وفور در سویه‌های مورد بررسی یافت شدند، در حالی که ژن‌های cry1c و cry1g در هیچ سویه‌ای وجود نداشتند. از این رو، سویه‌های حاوی ژن را می‌توان در آینده نزدیک برای مبارزه بیولوژیک علیه حشرات مربوطه انبوه سازی کرد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس، ژن های *cry1*، بالپولکداران، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خراسان، همدان.

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* یک باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت و اسپورزا است. این باکتری دارای ژن‌هایی با نام Cry است که پروتئین‌های کریستالی (crystal proteins) تولید می‌کند. این پروتئین‌ها بالغ بر ۲۰ تا ۳۰ درصد از کل پروتئین باکتری را در طول اسپورزایی شامل می‌شوند (۱).

ژن‌های توکسین به طور عادی روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارند و ممکن است بر روی یک پلاسمید،

چندین ژن مختلف Cry وجود داشته باشد. همه ژن‌های توکسین بر روی پلاسمیدها قرار ندارند و بعضی از آن‌ها روی ژنوم باکتری قرار دارند.

کریستال‌ها می‌توانند شکل مورفولوژیک متفاوتی داشته باشند که به وسیله میکروسکوپ الکترونی یا نوری، قابل رویت و تشخیص هستند. تاکنون در سویه‌های مختلف Bt چندین کریستال با شکل‌های مورفولوژیکی متفاوت دیده شده است (۲). کریستال‌های لوزی، اغلب فعالیت حشره‌کشی بر علیه بال پولک‌داران و سخت بال پوشان دارند، در حالی که کریستال‌های تخم مرغی و مکعبی، علیه بال پولک داران، دو بالان و سخت بال پوشان موثر هستند. مطالعات بلور شناسی پروتئین‌های cry نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها دارای سه ناحیه ویژه‌اند. ناحیه I شامل هفت ساختار آلفا هلیکس که در فعل و انفعالات غشا و تشکیل منافذ نقش دارد. ناحیه II از یک ستون سه گوش شامل سه ساختار بتا شیت که در اتصال سم به سلول‌های پوشش روده نقش دارد و ناحیه III شامل دو رشته آنتی پارالل بتا است که همانند ناحیه II در ثبات سم روی گیرنده و تنظیم کانال یونی نقش دارد.

این پروتئین‌ها برای بعضی از گونه‌های حشرات، سمی است. این فعالیت سمی شامل لارو حشرات مختلفی از جمله فلس بالان، دوبالان، سخت بال پوشان و همچنین موجوداتی از جمله کرم‌های پهن، نماتدها و تک یاخته‌ها می‌شود. مزیت عمدهٔ این باکتری، اختصاصی بودن برای میزبان‌های مختلف است، به طوری که برای حشرات و گیاهان دیگر، حالت سمی ندارد. نحوهٔ عملکرد این باکتری بدین صورت است که کریستال‌های پروتئینی پس از هضم توسط پروتئازهای موجود در قسمت میانی مجرای هاضمه حشره به جاهای ویژه‌ای در راس ریز پرزهای سلول‌های مخاطی مجرای هاضمه لاروها می‌چسبند و پس از چسبیدن، وارد فضای پلاسمایی سلول و باعث ایجاد جراحت و زخم شده که این زخم موجب ورود یون‌ها و آب و نهایتاً منجر به آماس و تخریب سلول می‌شود. بدین ترتیب، دیواره روده، پاره شده و موجب عفونت خون در حشره می‌شود. محققان ژن‌های Cry را با توجه به شباهت توالی‌هایشان و میزان عملکرد تخصصی آن‌ها به ۵ گروه مختلف تقسیم کرده‌اند: پروتئین‌های cry 1، cry 2، cry 4،3 cry و5 cry که به ترتیب برای بال پولک داران، بال پولک داران و دوبالان، سخت بال پوشان، دوبالان، لاروها و نماتدها سمی هستند (۳). پروتئین‌های cry6 نیز برای نماتدها سمی بوده اما به نظر می‌رسد که منشا آن‌ها با دیگر پروتئین‌های cry متفاوت است (۴).

ژن‌های cry1 که برای بال پولک داران سمی هستند، به هفت زیر مجموعه تقسیم می‌شوند (۵).

در این تحقیق با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، انواع ژن‌های زیرمجموعه ژن‌های cry1 در نمونه‌های Bt بومی استان‌های خراسان و همدان مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد استفاده

در این مطالعه، ۵۰ سویه Bt جداسازی شده از مزارع یا لاروهای *Heliothis* استان‌های خراسان و همدان مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های بومی مورد نظر، از موسسه اصلاح نهال و بذر و همچنین از موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی و نمونه‌های استاندارد نیز از مرکز (The Bacillus Genetic Stock Center) BGSC مطابق جدول ۱و۲ تهیه شدند.

آماده سازی نمونه‌ها و استخراج DNA

ابتدا باکتری در ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع LB مورد کشت قرار گرفتند. محیط LB یک مجموعه یا محیط نامعین است؛ یعنی مقدار و خصوصیات دقیق مواد آن مشخص نیست، زیرا دو تا از مواد متشکلهٔ آن، عصارهٔ مخمر و تریپتون است که

مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شیمیایی ناشناخته است. پس از کشت باکتری، ارلن‌ها به شیکر انکوباتور منتقل و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰-۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس، با استفاده از تست گرم که شامل رنگ‌آمیزی باکتری طی مراحل مختلف و بررسی مشخصات آن زیر میکروسکوپ بود، از رشد باکتری مورد نظر، اطمینان حاصل شد (۶).

جدول ۱- نمونه‌های بومی و محل جمع آوری

شماره نمونه	محل جمع آوری	شماره نمونه	محل جمع آوری
۱	خراسان	۳۲	خراسان
۲	خراسان	۴۸	همدان
۳	همدان	۴۹	همدان
۴	همدان	۵۰	همدان
۵	خراسان	۵۱	همدان
۶	خراسان	۵۲	همدان
۷	خراسان	۵۳	همدان
۸	خراسان	۵۵	خراسان
۹	همدان	۵۷	خراسان
۱۰	همدان	۵۹	خراسان
۱۱	خراسان	۷۲	خراسان
۱۲	همدان	۷۶	خراسان
۱۳	همدان	۷۸	خراسان
۱۴	همدان	۷۹	خراسان
۱۵	همدان	۸۱	خراسان
۱۶	خراسان	۸۳	خراسان
۱۷	خراسان	۸۴	خراسان
۱۸	همدان	۸۵	خراسان
۱۹	خراسان	۸۶	خراسان
۲۰	خراسان	۸۷	خراسان
۲۱	همدان	۸۹	خراسان
۲۲	همدان	۹۰	خراسان
۲۳	همدان	۹۱	خراسان
۲۴	همدان	۹۲	خراسان
۲۵	همدان	۹۳	خراسان

جدول ۲- مشخصات سویه‌های استاندارد به کار رفته در تحقیق

No	Serovar	Subspecies	Genes
1	HD1	*Bt kurstaki*	cry1a,cry1b
2	HD133	*Bt aizawai*	cry1c, cry1d, cry 1f
3	HD146	*Bt darmstadiensis*	cry1e, cry1g

پرایمرهای مورد استفاده

پرایمرها از شرکت BIONEER تهیه شدند. در جدول ۳، مشخصات پرایمرها ذکر شده است.

جدول ۳ - مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های cry1

Primer pair	Sequence	Gene recognized	Positions	Product size (bp)
CJI-1 CJI-2	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA3' 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA3'	Cry1a	3263-3285 3515-3534	272
CJ8 CJ9	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3' 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3'	Cry1b	1007-1025 1355-1374	367
CJ10 CJ11	5'AAAGATCTGGAACACCTTT3' 5'CAAACTCTAAATCCTTTCAC3'	Cry1c	1306-1325 1416-1436	130
CJ12 CJ13	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA3' 5'ATTTGAATTGTCAAGGCCTG3'	Cry1d	837-856 1107-1127	290
CJ14 CJ15	5'GGAACCAAGACGAACTATTGC3' 5' GGTTGAATGAACCCTACTCCC3'	Cry1e	1029-1050 1154-1175	147
CJ16 CJ17	5' TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC3' 5' CGGTTACCAGCCGTATTTCG3'	Cry1f	813-834 1451-1471	177
CJ18 CJ19	5' ATATGGAGTGAATAGGGCG3' 5' TGAACGGCGATTACATGC3'	Cry1g	1778-1797	235

سپس از محیط‌های کشت که حاوی باکتری‌های رشد کرده بود، ۱ سی سی برداشته و به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس با دستگاه میکروسانتریفوژ (مدل Spectrafuge 16M) به مدت ۳ دقیقه با سرعت rpm ۳۵۰۰، باکتری‌ها رسوب داده شد تا از محیط کشت جدا شوند.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به رسوب اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شده تا رسوب کاملاً در آب حل شود. محلول‌های حاوی رسوب، به فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل و یک ساعت در این دما قرار گرفتند. تیوپ‌ها بلافاصله به آب جوش منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۲۰ ثانیه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی که حاوی بیشترین میزان DNA بود به ویال دیگری منتقل و به عنوان نمونه DNA مورد استفاده قرار گرفت (۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

حجم هر واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ۱۵/۵ میکرولیتر ddH2O، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۷ میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفتی و برگشتی مربوط به ژن مورد نظر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Tag پلیمراز و نهایتاً ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر نمونه مورد بررسی بود که در نمونه‌های کنترل منفی، به جای آن از ۳ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد (۷).

واکنش توسط ترموسایکلر PCR (مدل PRIMUS 25) طبق برنامه زیر انجام شد:

ابتدا واسرشت سازی اولیه برای کلیه ژن‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه انجام شد (۵). تعداد چرخه‌های همانندسازی برای بررسی ژن‌های cry1d,cry1c,cry1b، ۲۵ چرخه (۸) و برای سایر ژن‌ها ۳۰ چرخه (۵) در نظر گرفته شد.

هر چرخه شامل مراحل زیر بود:

- واسرشت سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد.
- اتصال آغازگرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۳-۴۸ درجه سانتی‌گراد بر اساس دمای ذوب برای هر جفت پرایمر.
- مرحله توسعه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

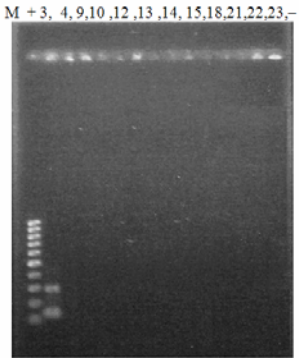
در پایان نیز یک مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای ژن‌های cry1c,cry1b و cry1d (۸) و برای سایر ژن‌ها به مدت ۵ دقیقه (۵) صورت گرفت.

جهت بررسی نتایج حاصل، الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز انجام شد. ژل‌های آگاروز با غلظت ۱/۲ درصد تهیه شد. ژل‌ها با بافر TBE 1X تهیه شدند. ولتاژ به کار رفته برای هر ژل، ۱۰۰ ولت و مدت زمان الکتروفورز با توجه به اندازه ژل، ۹۰-۴۵ دقیقه در نظر گرفته شد. در هر ژل به ترتیب از سمت چپ، اولین ردیف به مارکر bp ۱۰۰ اختصاص یافت. ردیف دوم حاوی نمونه‌های استاندارد و آخرین ردیف به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سایر ردیف‌ها نیز به نمونه‌های مورد بررسی اختصاص یافتند. پس از الکتروفورز، جهت رنگ‌آمیزی DNA، ژل‌ها در محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از عکس‌برداری، مورد بررسی قرار گرفت.

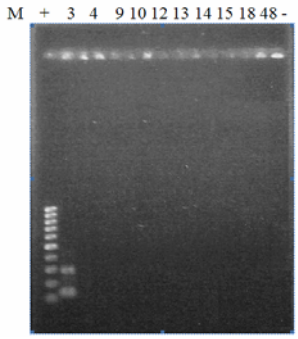
نتایج

بررسی‌ها بر روی ۵۰ سویه *Bacillus thuringiensis* نشان داد که ۷۸ درصد از کل نمونه‌ها حاوی انواع ژن‌های cry1 هستند که از این میزان، ۶۶/۶۷ درصد متعلق به استان خراسان و ۳۳/۳۳ درصد متعلق به استان همدان است.

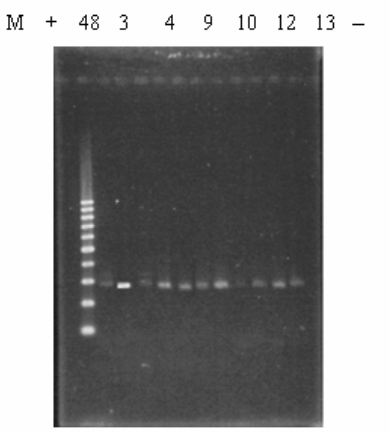
۸۰ درصد نمونه‌های استان خراسان و ۶۴ درصد نمونه‌های استان همدان حاوی ژن cry1a بودند (شکل ۱). ۲۰ درصد از سویه های استان خراسان دارای ژن cry1b بوده؛ در حالی که این ژن در هیچ کدام از نمونه های استان همدان یافت نشد. همچنین ژن cry1c نیز در هیچ کدام از نمونه های دو استان وجود نداشت. ۲۳/۳۳ درصد نمونه های استان خراسان حاوی ژن cry1d بوده در حالی که هیچ کدام از نمونه های استان همدان این ژن را نداشتند (شکل ۲). ۳/۳۳ درصد نمونه های استان خراسان و ۵۰ درصد نمونه های استان همدان حاوی ژن cry1e بودند (شکل های ۳ و ۴). تنها نمونه شماره ۸۴ از استان خراسان دارای ژن cry1e بود (شکل۲). ژن cry1f در ۳۰ درصد از نمونه های استان خراسان شناسایی شد، اما هیچ کدام از نمونه های استان همدان حاوی ژن cry 1f نبودند. ژن cry1g نیز در هیچ کدام از نمونه های دو استان یافت نشد.



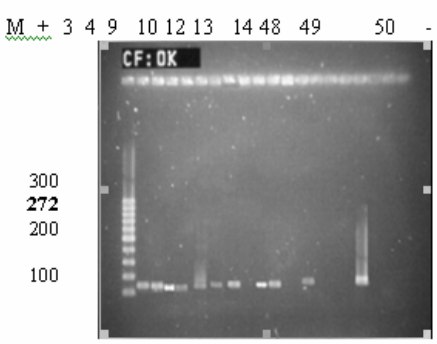
شکل ۱- نمونه هایی از سویه های Bt متعلق به استان همـدان که حاوی ژن cry1a با تولید باند bp ۲۷۲ مورد انتظار بودند.



شکل ۲- نمونه های استان همدان که هیچ کدام حاوی ژن های cry1c و cry1d که باید به ترتیب تولید باندهای bp ۱۳۰ و bp ۲۹۰ می نمودند نبودند.



شکل۳- نمونه ۴۸ از استان خراسان که حاوی ژن cry1e با تولید باند ۱۴۷ bp مورد انتظار بودند.

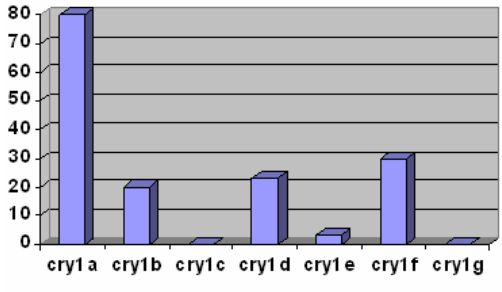


شکل ۴- نمونه های استان همدان که حاوی ژن cry1e با تولید باند ۱۴۷ bp مورد انتظار بودند.

فراوانی ژن های **cry1** به تفکیک استان

فراوانی ژن های cry1 در نمونه های بومی استان خراسان به قرار زیر است:

ژن cry1a ۸۰ درصد ، ژن cry1b ۲۰ درصد، ژن cry1c ۰ درصد، ژن cry1d ۲۳/۳۳ درصد، ژن cry1e ۳/۳۳ درصد، ژن cry1f ۳۰ درصد و ژن cry1g ۰ درصد (نمودار ۱).

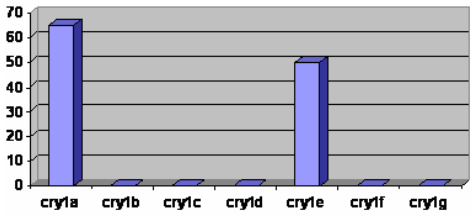


نمودار ۱- فراوانی ژن های cry1 در سویه های بومی استان خراسان.

بنابر نتایج فوق، در سویه های بومی استان خراسان، بیشترین فراوانی مربوط به ژن cry1a است؛ در حالی که فراوانی سایر ژن‌ها به طور محسوسی کاهش یافته است؛ به طوری که فراوانی ژن های cry1g و cry1c به صفر می رسد.

در سویه های بومی استان همدان نیز فراوانی ژن‌های cry1a به قرار زیر حاصل شد :

ژن cry 1a ۶۵درصد، ژن cry1b ۰ درصد، ژن cry1c ۰ درصد، ژن cry 1d ۰ درصد، ژن cry 1e ۵۰ درصد، ژن cry 1f ۰ درصد و ژن cry 1g ۰ درصد (نمودار ۲).



نمودار ۲- فراوانی ژن‌های cry1 در سویه‌های بومی استان همدان.

بر اساس نتایج بدست آمده، سویه های بومی استان همدان تنها دارای ژن های cry1e, cry1a هستند. البته میزان ژن های cry1a بیشتر است. سایر ژن های cry1 در هیچ کدام از نمونه های استان همدان یافت نشد.

بحث

تاکنون تحقیقاتی در مورد ژن های *cry* در داخل و خارج از کشور صورت گرفته که می توان به موارد زیر اشاره نمود:

جهانگیری و همکاران (۱۳۸۷) (۹) ۷۰ جدایه بومی باکتری Bt جداسازی شده از خاک های زراعی مناطق مختلف را از نظر وجود ژن های *cry* ، *cyt* ، *vip* و وجود ژن های جدید مورد بررسی قرار دادند. نتایج کار نشان داد که هر یک از سویه های بومی، حاوی ۱۵ تا ۴۰ ژن مختلف *cry* ، *cyt* و *vip* بودند.

نظریان و همکاران (۱۳۸۷) (۶) خصوصیات مولکولی و مورفولوژیک ۷۰ سویه بومی Bt موثر بر آفات راسته سخت بال پوشان را که از مناطق مختلف کشور جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار دادند. شناسایی سویه ها بر اساس تکنیک PCR و با استفاده از ۲۱ پرایمر عمومی و اختصاصی برای ژن های *cry*35, *cry*34, *cry*4, *cry*7, *cry*18, *cry*1, *cry*14, *cry*3, *cry*8, *cry*28, *cry*26 که پروتئین های فعال علیه آفات راسته سخت بال پوشان را کد می کنند صورت گرفت. آن ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ۲۹ پروفیل ژنی به دست آوردند که نشان دهنده تنوع ژنی این ژن ها در سویه های بومی بود.

خجند و همکاران (۱۳۸۶) (۱۰) ایزوله‌های Bt مناطق مختلف ایران را توسط آزمون های بیوشیمیایی افتراقی، شامل تولید آرژینین دی-هیدرولاز، اوره آز، احیای نیترات، مصرف قندها و سیترات و آزمون VP از یکدیگر تفکیک کردند. برای تعیین تنوع ژنی، از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های cry1, cry2, cry3, cry4, cry7, 8 استفاده کردند. نتایج PCR نشان داد که ۸۷/۵ درصد نمونه ها دارای ژن cry1 ، ۹۱/۱۱ درصد cry2 ، ۴۱/۶۶ درصد cry3 ، ۴۵/۸۳ درصد cry7 و ۰ درصد cry8 بودند که در مقایسه با تحقیق فوق که تنها برای استان های خراسان و همدان صورت گرفته، میزان ژن های cry1 ، ۹/۵ درصد بیشتر بود.

صیفی نژاد وهمکاران (۲۰۰۸) (۱۱) ۷۰ استرین Bt جدا شده از خاک نواحی مختلف اکولوژیکی ایران را بر پایه تجزیه PCR با استفاده از ۲۵ پرایمر عمومی و اختصاصی برای ژن‌های cry9, cry2, cry1 و vip3Aa کد کننده پروتئین‌های فعال علیه بال پولک داران را بررسی کردند. ایزوله های دارای ژن vip3Aa بیشترین فراوانی (۸۲/۶ درصد) را داشته و به دنبال آن ژن cry2 (۵۶/۵ درصد)، ژن cry1 (۴۹ درصد) و ژن cry9 (۳۰ درصد) به ترتیب بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. از این رو در مقایسه با تحقیق فوق که میزان ژن های cry1 ، ۷۸ درصد بود، ۲۹ درصد کاهش ژن های cry1 مشاهده می شود.

سرون و همکاران (۱۹۹۵) (۵) ژن‌های مختلف cry1و cry3 را در نمونه های Bt که از نقاط مختلف مکزیک جمع آوری شده بودند، شناسایی کردند. آن‌ها با تکنیک PCR و استفاده از پرایمرهای عمومی و اختصاصی موفق شدند ۱۰ ژن مختلف cry1 و ۵ ژن cry3 را شناسایی کنند.

بن داو و همکاران (۱۹۹۷) (۱۲) نمونه های Bt را از لاشه حشرات و نمونه های خاک، تهیه و با Multiplex PCR ، ۲۰ نوع cry1، ۳ نوع cry2، ۴ نوع cry3، ۲ نوع cry4 ، ۲ نوع cry7 و ۳ نوع cry8 را شناسایی کردند.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، درصد بالایی از سویه های باکتری استان های خراسان و همدان حاوی ژن cry1 هستند. همان طور که ذکر شد این ژن می تواند علیه آفات راسته بال پولک داران به کار رود.

کنترل آفات و بیماری های گیاهی با استفاده از سموم شیمیایی، خسارات جبران ناپذیری بر سلامت مردم و محیط زیست وارد می کند. علاوه بر این، با توجه به هزینه بالای سموم شیمیایی، استفاده از این

آفت کش های بیولوژیک از لحاظ اقتصادی، بسیار مقرون به صرفه است. برای پی بردن به اهمیت این موضوع، وضعیت یکی از مهم ترین محصولات کشور، یعنی گندم مورد بررسی قرار می‌گیرد.

گندم عمده ترین محصول زراعی کشور است. سطح زیر کشت گندم در ایران حدود ۶/۴۱ میلیون هکتار برآورد شده است. استان خراسان با ۱۰/۸۵ درصد کل اراضی گندم کشور، بیشترین سطح را به خود اختصاص داده است.

در ایران بیش از ۷۰ گونه حشره گیاه خوار شناسایی شده اند که به عنوان مصرف کنندگان اولیه از گندم و جو تغذیه می کنند. بسیاری از این حشرات، به راسته بال پولک داران تعلق دارند؛ یعنی آفاتی که به سموم حاصل از ژن هایcry1 حساس هستند.

بیش از ۱۰ گونه از بال پولک داران زیان آور برای گندم شناسایی شده اند که در مرحله لاروی به گندم و جو خسارت می زنند. از مهم ترین این گونه ها می توان مینوز برگ غلات، کرم ساقه خوار گندم، کرم ساقه خوار اروپایی ذرت، کرم ساقه خوار ذرت، کرم ساقه خوار نیشکر، آگروتیس، کرم طوقه بر و پروانه خوشه خوار گندم را نام برد. آفت مینوز برگ غلات (*Syringopais temperatella*) با نام برگ خوار غلات معرفی شده است (۱۴،۱۳) اما با توجه به نحوه خسارت لارو آن، نام مینوز برگ غلات برای آن مناسب تر است.

این آفت که تاکنون از استان های خوزستان، فارس، بوشهر، ایلام، چهارمحال و بختیاری، کرمانشاه، خراسان، گلستان، گیلان ومازندران گزارش شده است یکی از مهم ترین آفات گندم و متعلق به راسته بال پولک داران است.

در سال زراعی ۷۹-۱۳۷۸ در تراکم های ۱۰۰ و ۱۵۰ بوته در متر مربع، در مزارعی که تراکم لاروها به ترتیب بیشتر از ۵ و ۹ لارو در هر بوته بود، کنترل شیمیایی صورت گرفت.

جهت کنترل شیمیایی، در اوایل پنجه زنی گیاه، از سم دیازینون ۶۰ درصد EC به میزان یک لیتر در هکتار استفاده شد. بدین ترتیب در ۵۷۰۰ هکتار از اراضی گندم کشور مبارزه شیمیایی صورت گرفت (۱۵).

بر اساس بررسی انجام شده، هر لیتر از سم مورد نظر بین ۹۵۰۰ تومان (تولید شرکت غزال شیمی) تا ۱۱۳۰۰ تومان (تولید شرکت آریا شیمی) قیمت دارد.

بنابراین جهت سمپاشی ۵۷۰۰ هکتار اراضی گندم در سال زراعی ۷۹-۱۳۷۸ تقریباً ۶۰ میلیون تومان هزینه شده است. این رقم ارزش باکتری Bt را به واسطه دارا بودن ژن های cry1 نشان می دهد. این رقم، تنها هزینه مصرف سموم شیمیایی طی یک سال و تنها برای محصول گندم را نشان می دهد. در صورتی که محصولات مختلف، سطوح زیر کشت بسیاری را به خود اختصاص می دهند و این در حالی است که بسیاری از حشرات متعلق به راسته بزرگ بال پولک داران، آفات بسیاری از غلات، درختان میوه و حتی گیاهان زینتی هستند.

بررسی خسارات ناشی از آفات فوق، نه تنها زیان-های اقتصادی مربوطه را نشان می دهد، بلکه بیانگر هدر رفتن میزان زیاد نیروی کار در کشور است. علاوه بر مسائل فوق، باید در نظر داشت که کنترل آفات و بیماری های گیاهی با استفاده از سموم شیمیایی، خسارات جبران ناپذیری بر سلامت مردم و محیط زیست وارد می کند که هر کدام به نوبه خود جای بحث و بررسی دارد.

امروزه به دلیل درک صحیح از مزایای کنترل بیولوژیک در کشورهای مختلف دنیا، میزان مبادلات تجاری سموم بیولوژیک به بیش از ۳۰۰ میلیون دلار می رسد و بیش از هزاران فرمولاسیون و محصولات مختلف تجاری به عنوان سموم و کودهای بیولوژیک در بازار جهانی موجود است که در این میان باکتری Bt به دلیل اهمیت بالا در کنترل آفات خاص و عدم

اثر سوء بر محیط زیست و سلامت انسان، به یک عامل بیولوژیک منحصر به فرد تبدیل شده و در حال حاضر سموم حاصل از این باکتری، عمده ترین سموم بیولوژیک مورد کاربرد در جهان (بیش از ۸۰ درصد) است. در سال ۲۰۰۹ میزان فروش آن در دنیا بیش از ۲۰۰ میلیون دلار بوده است. علاوه بر این، تولید محصولات تراریخته Bt نیز یکی از راه کارهای مهمی است که در کشورهای مختلف دنیا دنبال می-شود.

باوجود تمام پیشرفت هایی که در این زمینه انجام شده، متاسفانه تاکنون تحقیقات محدودی در خصوص باکتری های بومی Bt در ایران صورت گرفته است.

بنابراین شناخت باکتری های بومی Bt مناطق مختلف کشور، همچنین بررسی های ژنتیکی این ایزوله‌ها و تشخیص ژن های مربوطه خصوصاً ژن های جدیدی که تاکنون شناسایی نشده و توالی یابی و شناخت فعالیت آن‌ها جهت تولید سموم ارگانیک و همچنین محصولات تراریخته (GMO) امری مهم و ضروری است که در صورت حمایت مسؤولان امر، علاوه بر فواید یاد شده می تواند اشتغال زایی و در آمد زایی بالایی داشته و از هدر رفتن سرمایه های ملی جلوگیری نماید.

منابع مورد استفاده

۱- نظریان آمیرانی، امین؛ غ. صالحی جوزانی؛ م. کشاورزی و م. ا. حجازی.۱۳۸۷. غربال سازی مورفولوژیک و مولکولی سویه های بومی Bacillus thuringiensis ایران برای شناسایی سویه های موثر بر آفات مهم راستهٔ سخت بال پوشان، پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، رشتهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ، تهران، ۱۳۸۷.

۲- جهانگیری، ر؛ غ. ص. جوزانی؛ خ. ع. سعید؛ ح. مصدق و ا. نظریان. (۱۳۸۷). شناسایی ژن‌های جدید cry در جدایه های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* ایران. خلاصه مقالات دهمین کنگره ژنتیک ایران. ۳-۱ خرداد ۱۳۸۷. ۴۶۳ صفحه

۳- خجند، سهیلا؛ م. کشاورزی؛ ک. زرگری و ح. عبدالهی. ۱۳۸۶. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس ترنجین سیس، پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، رشتهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ۱۳۸۶.

۴- اقلیدی، سیف اله. ۱۳۴۰. پروانه خوشه خوار گندم. نشریهٔ شماره ۲۰ موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. صفحات ۱- ۴.

۵- اقلیدی، سیف اله.۱۳۴۰. برگ خوار گندم. نشریهٔ شماره ۲۰ موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. صفحات ۵-۱۵.

۶- امینی، فرهاد. ۱۳۷۹. آفات غیرهمگانی گندم و جو(خصوصی) و نگرشی بر چگونگی عملیات مبارزه با آفات غیر عمومی گندم. مدیریت مبارزه با آفات زراعی، سازمان حفظ نباتات. ۸۹ صفحه.

7- Boucias, D. G., and J. C. Pendland. 1998. Principeles of insect pathology. Kluwer Academic Publisher, Norwel, Massachusetts.

8- Espinasse, S., M. Gohar, J. Chaufaux, C. Buisson, S. Perchat, and V. Sanchis. 2002. Correspondence of High Levels of Beta-Exotoxin I and the Presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 68, No. 9, 775-806.

9- Obeidat, M., Hassawi, D., Ghabeish, I., 2004. Characterization of Bacillus thuringiensis strains from Jordan and

their toxicity to the Lepidoptera, Ephestia kuehniella Zeller. African Journal of Biotechnology 3 (11), 226–622.

10- Franco-Rivera, A., Benintende, G., Cozzi, J., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcon, J.J., Lopez-Meza, J.E., 2004. Molecular characterization of Bacillus thuringiensis strains from Argentina. Antonie van leeu 86, 87–92.

11- Ceron,J., A.Ortiz, R.Quintero, L. Guereca, and A. Bravo.1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Applied And Environmental Microbiology. Vol.61, No. 11, 3826-3831.

12- Lin., L., G. Fang, K. Peng. 2007. Characterization of the highly variable cry gene regions of Bacillus thuringiensis strain by PCR-SSCP proofiling and sequencing. Biotechnology Letters.29:247-251.

13- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo.1994. PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Crystal Family Genes from *Bacillus thringiensis*. Applied And Environmental Microbiology.Vol.60, No. 1, 353-356.

14- Seifinejad. A., G.R. Salehi Jouzani, A. Hosseinzadeh, and C. Abdmishani. 2008. Caracterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian Bacillus thuringiensis strain collection. Biological Control. 216-226.

15- Ben-dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob,A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky,N. Berezina, and Y. Margalith. 1997. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 63, No. 12, 4883-4890.