بررسی برخی خصوصیات ژنی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان

Study some of the genetic characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from forest soil of Golestan Province

مرضیه شازده احمدی[1*]، سید افشین سجادی[1] و زین‌العابدین شهادتی مقدم[1]

دریافت: ۹۷/۹/۲۵ پذیرش: ۹۸/۲/۱۰

چکیده

جدایه‌های بومی باکتری (Bt) *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های مناطق جنگلی شهرستان‌های مختلف استان گلستان جداسازی و ژن *Cry* و *Vip* عامل تولید توکسین و پروتئین مؤثر روی حشرات در آن‌ها ردیابی شد. از کل ۴۲ نمونه خاک مورد بررسی از طریق بازدارندگی انتخابی استات سدیم، تعداد ۱۶۰ جدایه Bt جداسازی گردید. پس از کشت کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی اختصاصی و شناسایی میکروسکوپی در ۴۰ درصد از جدایه‌ها انجام شد، پروتئین کریستالی کشنده برای بسیاری از حشرات مشاهده گردید. بررسی مولکولی جدایه‌های Bt نشان داد که در ۱۲ جدایه ژن‌های *Cry* و *Vip* وجود داشتند. آزمایشات تعیین ساختار ژنی برای وجود سه ژن *Cry 1A* (شامل *Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac*) و ژن‌های *Cry1I*، *Cry1F*، *Cry2*، *Cry9* و *Vip3Aa* با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. ژن‌های *Cry1Ab*، *Cry2* و *Cry1F* در همه جدایه‌ها مشاهده شد، ولی ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1I* و *Cry1Ac* فراوانی بسیار کم (کم‌تر از ۲۰ درصد) داشتند و یا در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشدند. نتایج این تحقیق می‌تواند برای ردیابی جدایه‌های بومی باکتری Bt که دارای پروتئین‌های کریستالی مؤثر روی حشرات هستند، مفید واقع شود.

واژگان کلیدی: پروتئین کریستالی، ژن‌های *Cry* و *Vip*، *Bacillus thuringiensis* ، شناسایی مولکولی

۱- محقق، گروه گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، بهشهر، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: noshinshazdeahmadi@yahoo.com

مقدمه

نیاز حیاتی برای ترکیبات امن و مؤثر به‌عنوان جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی، علاقه به کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک را افزایش داده است. عوامل میکروبی عموماً علیه آفات هدف بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، بنابراین اثرات زیست محیطی کمتری دارند و موجب زنده ماندن حشرات مفید در اکوسیستم‌های مختلف می‌شوند.

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) یک باکتری گرم مثبت و اسپورزاست که اغلب به عنوان یک حشره‌کش بیولوژیک در سطح وسیع در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Apaydin *et al*., 2005). این باکتری در طی فرآیند اسپورزایی، پروتئین کریستالی تولید می‌کند که دلتااندوتوکسین نام داشته و قابلیت حشره‌کشی زیادی روی لاروهای حشرات راسته‌های مختلف اعم از بال‌پولک‌داران، سخت‌بال‌پوشان و دوبالان و نماتدها دارد (Cinar *et al*., 2008). کریستال‌ها می‌توانند شکل متفاوتی داشته باشند که به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی یا نوری قابل رؤیت و تشخیص هستند (Hannay and Fitz, 1955). محققان، ژن‌های *Cry* را با توجه به شباهت توالی‌ها و میزان عملکرد اختصاصی آن‌ها به چندین گروه مختلف تقسیم کرده اند: پروتئین‌های *Cry1*، *Cry2*، *Cry3*، *Cry4*، *Cry5*، *Cry6* و *Cry9*. پنج تای اول به ترتیب برای لارو حشرات راسته‌های بال‌پولک‌داران، بال‌پولک‌داران و دوبالان، سخت بال‌پوشان، دوبالان و نماتدها کشنده بوده‌اند (Seifinejad *et al*., 2008). پروتئین‌های *Cry6* نیز برای نماتدها سمی هستند، اما به نظر می‌رسد که منشأ آن‌ها با سایر پروتئین‌های *Cry* متفاوت باشد (Pooja *et al*., 2013). پروتئین‌های *Cry9* نیز علیه بال‌پولک‌داران سمی گزارش شده‌اند (Martinez *et al*., 2002).

حشره‌کش‌های بیولوژیک با پایه Bt در سراسر جهان برای کنترل انواع لاروهای آفات مهم کشاورزی به کار می‌روند. مزیت عمده این باکتری، اختصاصی بودن آن برای میزبان‌های مختلف است، به‌طوری‌که برای حشرات و موجودات زنده غیرهدف اثر سمی ندارد (Apaydin *et al*., 2005). نحوه عملکرد باکتری بدین صورت است که پس از بلعیده شدن مخلوط اسپور- کریستال باکتری Bt توسط لارو، کریستال در محیط قلیایی معده میانی حشره حل شده و سپس پیش توکسین‌ها از طریق پروتئازهای معده میانی به پپتیدهای سمی فعال تبدیل می‌شوند. توکسین فعال با اتصال بر روی گیرنده‌های سطح سلول‌های معده میانی با ایجاد منافذی در غشاء سلول، عملکرد بخش میانی دستگاه گوارش حشره را مختل و در نهایت موجب مرگ آن حشره می‌شود (Hannay and Fitz, 1995). امروزه باکتری Bt از منابع مختلف در سراسر جهان جمع‌آوری و گزارش شده است، از جمله می‌توان به جداسازی آن از لاشه سوسک‌های توتون و بقایای گیاهی توتون در کشورهای مختلف (Kaelin *et al*., 1994)، نمونه‌های خاک و محصولات انباری از کره جنوبی (Kim *et al*., 1998) و چین (Hongyu *et al*., 2000)، زیستگاه‌های آبی و خاکی در اسپانیا (Martinez *et al*., 2005)، زیستگاه‌های حبوبات در ترکیه (Apaydin *et al*., 2005)، لجن فاضلاب در کانادا (Mohammedi *et al*., 2006) و باغات زیتون در ترکیه (Cinar *et al*., 2008) اشاره نمود. اگرچه باکتری Bt از منابع مختلفی جداسازی شده است، اما نمونه‌های خاکی فراوان‌ترین و متنوع‌ترین منبع باکتری Bt بوده اند (Aramideh *et al*., 2010).

اکوسیستم‌های جنگلی از پوشش‌های گیاهی متنوع و پایداری برخوردار هستند، در نتیجه تنوع زیستی بالایی نیز دارند و زیستگاه مناسبی برای انواع حشرات و میکروارگانیسم‌های موجود در خاک در اختیار می‌گذارند. در کنار آن، عامل مهم دیگری که می‌تواند نقش بسزایی در ایجاد تنوع زیستی بالا داشته باشد و این ویژگی را تداوم بخشد، استفاده نکردن و یا استفاده کمتر از آفت‌کش‌های شیمیایی در اکوسیستم جنگل است که می‌تواند به حفظ تنوع زیستی کمک کند. تمامی این عوامل در کنار هم شرایط مناسبی را به منزله یک منبع و یا یک زیستگاه مناسب برای باکتری Bt فراهم می‌کنند؛ بنابراین، خاک‌های نواحی جنگلی، منبعی مناسب برای یافتن جدایه‌های مؤثر باکتری Bt و کنترل بیولوژیک آفات است (گرایلی و همکاران، ۱۳۹۳).

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 به همین دلیل Bt را می‌توان از اغلب نقاط دنیا جمع‌آوری نمود. همچنین شناسایی جدایه‌های جدید Bt و ژن‌های توکسین *Cry* آن‌ها، می‌تواند در تولید آفت‌کش‌های جدید و عدم ایجاد مقاومت به این ژن‌ها بسیار مؤثر باشد (Salehi Jouzani *et al*., 2008). شناسایی ژن‌های *Cry* باکتری Bt با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ انجام شد (Carrozi *et al*., 1991). شناسایی ژن‌های سمی Bt از طریق PCR می‌تواند در پیش‌بینی فعالیت حشره‌کشی جدایه‌های شناسایی شده کمک کند. این روش‌ها سریع، مؤثر و مطمئن‌تر بوده و جانشین مناسبی برای روش‌های سنتی مبتنی بر زیست‌سنجی هستند. همچنین در روش‌های مولکولی با ساخت آغازگرهای جدید می‌توان از آن‌ها برای شناسایی ژن‌های *Cry* و *Vip* جدید و سایر ژن‌های تولید کنندهٔ توکسین استفاده نمود. در شیوه‌های جدید مولکولی برای ردیابی جدایه‌های موثر، دقت کار افزایش و زمان انجام آزمایش‌ها کاهش یافته است (Porcar and Juarez- perez, 2003). تاکنون توسط محققان در سراسر جهان، بیش از ۳۵۰ ژن *Cry* توالی‌یابی شده‌اند که گروه‌های اصلی *Cry*1 تا *Cry*5 را شامل می‌شوند. در این میان، گروه‌های *Cry1*، *Cry2* و *Cry9* بیش‌ترین کارایی را برای کنترل آفات گونه‌های بال‌پولک‌داران داشته‌اند. ژن‌های *cry1* فراوان‌ترین ژن‌های *Cry* در طبیعت بوده و بیش از ۴۳ درصد از توالی‌های *Cry* شناخته شده متعلق به این گروه بوده است (Pooja *et al*., 2013).

سیفی‌نژاد و همکاران (۲۰۰۸)، شناسایی محتویات ژنی *Cry* و *Vip* موثر بر آفات پروانه‌ای در ۷۰ سویه Bt جداسازی شده از مناطق مختلف اکولوژیکی ایران را با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که به ترتیب بیش‌ترین فراوانی در جدایه‌های محتوی ژن *Vip 3Aa*، *Cry2*، *Cry1* و *Cry9* بوده است. سپس، آن‌ها بر اساس مطالعات مولکولی، ۲۰ جدایه فعال اختصاصی علیه راسته بال‌پولک‌داران را برای انجام آزمایشات زیست سنجی روی لاروهای آفت کرم غوزه پنبه انتخاب نمودند (Seifinejad *et al*., 2008). گرایلی و همکاران (۱۳۹۳) از خاک‌های جنگلی مناطق مختلف استان مازندران، تعداد ۱۴۴ جدایه باکتری Bt را جداسازی کرده و ژن *Cry1* عامل تولید پروتئین مؤثر روی حشرات در آن‌ها را با استفاده از ۱۴ جفت پرایمر اختصاصی شناسایی و ردیابی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن‌های *Cry1Aa* و *Cry1I* در تمام جدایه‌ها وجود داشتند، ولی سایر ژن‌ها یا دارای فراوانی بسیار کم بوده و یا در هیچ جدایه‌ای وجود نداشتند. آن‌ها همچنین بیان کردند که پتانسیل سمیت جدایه‌های Bt به نوع و زیرگروه‌های ژن *Cry* آن وابسته است. تولید مداوم و تکثیر مناسب این قطعات متفاوت در جدایه‌های مورد نظر، نشان دهنده اندازه متفاوت ژن‌ها در این جدایه‌های بومی است (گرایلی و همکاران، ۱۳۹۳).

هدف از این پژوهش، جداسازی جدایه‌های بومی باکتری Bt از خاک‌های مناطق جنگلی شهرستان‌های مختلف استان گلستان و بررسی وجود ژن‌های *Cry* و *Vip* (عامل تولید توکسین مؤثر روی آفات راسته بال‌پولک‌داران) بود. علاوه بر این با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای زیرگروه‌های ژن *Cry1*، ژنوتیپ جدایه‌های دارای این ژن تعیین و بر این اساس، قابلیت احتمالی حشره‌کشی آن‌ها نیز پیش‌بینی می‌شود و در آینده می‌توان از جدایه‌های بومی برتر برای تولید حشره‌کش‌های بیولوژیک در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

برای نمونه‌برداری، در بهار سال ۱۳۹۵ خاک‌هایی از منطقه رایزوسفر از عمق دو الی پنج سانتی‌متری توسط بیلچه سترون جمع‌آوری و نمونه‌های خاک به داخل کیسه‌های پلاستیکی سترون انتقال و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش

توتون تیرتاش حمل شدند. این نمونه‌ها از خاک‌های مناطق جنگلی مختلف استان گلستان شامل ۱۴ شهرستان بندرگز، کردکوی، گرگان، گمیشان، علی آباد کتول، آق قلا، بندرترکمن، رامیان، آزادشهر، مینودشت، گالیکش، کلاله، گنبدکاووس و مراوه تپه جمع‌آوری شدند (شکل ۱). از هر شهرستان سه نمونه و در مجموع ۴۲ نمونهٔ خاک برای جداسازی باکتری Bt برداشت گردید.

ش‌کل ۱- مکان‌های نمونه‌برداری از خاک‌های جنگلی شهرستان‌های مختلف استان گلستان

Fig. 1. Sampling locations from the forest soil of different county of Golestan Province

جداسازی اختصاصی باکتری Bt

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی استات سدیم استفاده شد. بدین طریق که یک گرم از نمونه به مدت سه ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ در ۲۰ ml محیط کشت مایع محتوی استات سدیم ۰/۲۵ مولار با pH=8 کشت داده شد. استات سدیم به طور اختصاصی مانع از جوانه‌زنی اسپورهای باکتری Bt می‌شود. ۱ ml از هر نمونه کشت داده شده به مدت ۲۰ دقیقه تحت شوک حرارتی $^{\circ}C$ ۷۰ – ۶۰ قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه زده سایر باکتری‌ها از بین رفته و فقط اسپورهای مقاوم و جوانه نزده Bt باقی ماندند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt (NA, T_3 , LBA) کشت داده شدند. پس از گذشت سه الی پنج روز از کشت، کلنی‌های باکتری بر اساس شکل ظاهری کلنی (دو هرمی) و رنگ (سفید مات) گزینش اولیه شده و درون آب نمک ۰/۹ درصد در دمای $^{\circ}C$ ۴ نگهداری شدند (Travers *et al*., 1987).

کشت باکتری و شناسایی میکروسکوپی

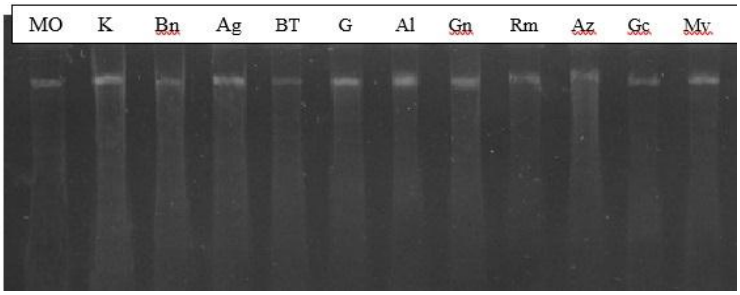
جدایه‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت ذکر شده، خالص‌سازی شدند. پس از گذشت سه الی پنج روز از کشت، با استفاده از روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و بر اساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) مورد شناسایی قرار گرفتند (گرایلی و همکاران، ۱۳۹۳).

استخراج DNA جدایه‌های باکتری Bt

باکتری‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت تکثیر شدند. مقداری از نمونه کشت شده داخل ۱ ml از محلول ۱ حاوی Tris 0.01 M با (pH=8)، EDTA (0.001 M) و NaCl (1M) قرار گرفت و سانتریفیوژ شد. سپس به پلیت ۲۰۰µL از بافر استخراج Tris (0.025 M) با pH = 8 ، EDTA (0.01 M)، ساکارز ۲۵٪ و لایزوزایم (4mg/ml) اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار گرفت. سپس از محلول ۲ حاوی NaOH 10M (به میزان ۲mL)، SDS 10% (به میزان ۱۰ml) و آب مقطر استریل (به میزان ۸۸mL) به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- قرار داده شد. مقدار ۲۰۰ µL از

NaCl (5M) به آن افزوده و به مدت ۴۰ دقیقه داخل فریزر با دمای $^{\circ}C$ ۲۰- قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۴ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد و به مقدار دو برابر محلول برداشته شده به آن، اتانول سرد ($^{\circ}C$ ۲۰-) اضافه گردید و سانتریفیوژ شد. پلت ایجاد شده با اتانول ۷۰٪ دوبار شستشو شد و پس از خشک کردن آن، در محلول TE محتوی Tris (10mM) و EDTA (1mM) حل شد (Rolle *et al*., 2005).

سپس، برای تعیین کمیت DNAهای حاصل، از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV2100، ساخت شرکت یونیکو آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. برای ارزیابی کیفیت باندهایDNA، نمونه‌های DNA استخراج شده از هر جدایه، روی ژل آگارز ۰/۸درصد، در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. بعداز رنگ‌آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید از ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک (مدل E-BOX-UX5) عکس‌برداری شده و کیفیت باندهای DNA استخراج شده بررسی شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمایی از DNAهای استخراج شده از جدایه‌های بومی باکتری Bt روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

Fig. 2. View of DNA extracted from native Bt isolates on Agarose gel 0.8%

انتخاب آغازگرهای اختصاصی

برای آنالیز و شناسایی انواع ژن‌های *Cry* و *Vip* موثر بر آفات پروانه‌ای، هشت جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده توسط Seifinejad *et al.* (2008) به کار گرفته شد (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Characteristics of the specific primers used in this research.

Primer آغازگر	توالی Sequence	Positions موقعیت	Gene(s) ژن	اندازه محصول PCR (bp) PCR Product size	شماره دسترسی بانک ژن GenBank Accession No.
UNcry1(+)	5'-tracrhtddbdgtattagat-3'	726	*cryI Aa*	1500-1600	
UNcry1(-)	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'	2268			
SPcry1Ab(+)	5 '- cggatgctcatagaggagaa-3'	940	*cry1Ab*	1371	M13898
UNcry1(-)	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'				
SPcry1Ac(+)	5 '- ggaaactttcttttttaatgg-3 '	1452	*cry1Ac*	844	M11068
UNcry1(-)	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'				
SPcry1F(+)	5 '- gatttcaggaagtgattcat-3 '	1302	*cry1F*	967	M63897
UNcry1(-)	5'-mdatytctakrtcttgacta-3'				
SPcry1I(+)	5 '-acaatttacagcttattaag-3 '	1027	*cry1I*	1000	X62821
SPcry1I(-)	5 '-ctacatgttacgctcaatat-3'	2141			
UNcry2(+)	5 '-gttattcttaatgcagatgaatggg-3 '	726-750 , 1402-1426,		701	M31738
UNcry2(-)	5 '-cggataaaataatctgggaaatagt-3 '	1444-1468, 2120-2144,	*All cry2 genes*	701	X55416
		2695-2719, 3359-3383		689	X57252
		2774–2797, 3104–3127			X58120
UNcry9(+)	5 '- cggtgttactatt agcgagggcgg-3 '	2272–2295, 2602–2625	*All cry9 genes*	351-354	X75019
UNcry9(-)	5 '- gtttgagcc gcttcacagcaatcc-3 '	4354–4377, 4681–4704			Z37527
		2338–2361, 2668–2691			D85560
SPvip3A(+)	5 '- cctctatgttgagtgatgta -3 '	365	*vip3Aa*	1000	AAC37036
SPvip3A(-)	5 '- ctatactccgcttcacttga -3'	1394			

ردیابی مولکولی ژن‌های موثر در جدایه‌های بومی باکتری Bt

برای شناسایی ژن‌های ذکر شده، واکنش PCR با استفاده از هشت جفت پرایمر اختصاصی و بر طبق روش توصیف شده توسط (Juarez- perez *et al*., 1997) انجام شد. برای ایجاد بهترین شرایط PCR و محاسبه دمای آنیلینگ پرایمرها، غلظت‌های مناسب اجزا تشکیل دهنده PCR و دماهای آن‌ها، آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید و واکنش در چند مرحله بهینه‌سازی شد. واکنش PCR در حجم کلی ۲۵ µL مخلوط واکنش، شامل (۱۴ µL از آب مقطر استریل، ۲/۵ µL از PCR buffer، ۰/۷ µL از dNTP با غلظت ۱۰ ماکرومولار، ۲ µL از هر کدام از آغازگرهای رفت (F) و برگشت (R)، ۰/۳µL از Taq DNA Polymerase، ۱/۵ µL از $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و ۲µL از DNA باکتری Bt) بود.

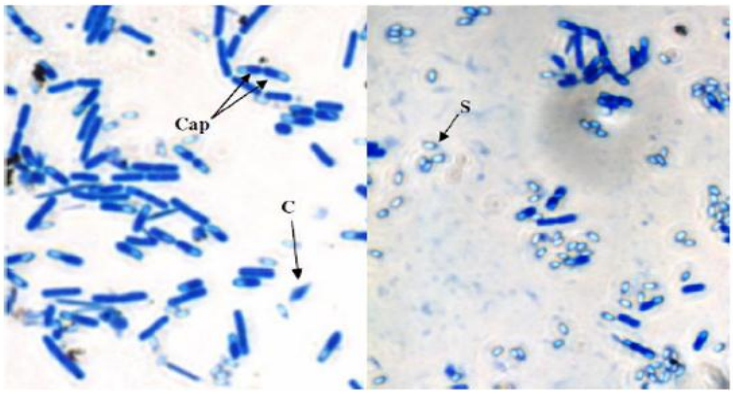
مراحل تکثیر واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل MJ-MINI، ساخت شرکت BIO-RAD) که برای ۳۵ سیکل تنظیم شده بود، بدین شرح انجام پذیرفت: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای $^{\circ}C$۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای $^{\circ}C$۶۵ - ۵۰ به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن به مدت ۲ دقیقه در دمای $^{\circ}C$۷۲ و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای $^{\circ}C$۷۲ بود.

بعد از اتمام مراحل واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر، محصول تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۸ درصد رانده شد و نمونه‌ها به مدت سه ساعت در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و فراوانی وجود انواع ژن‌های *Cry* و *Vip* در این جدایه‌های بومی Bt بررسی گردید.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها بر اساس شاخص‌های مورفولوژیک

در ابتدا بر اساس شکل ظاهری کلنی Bt (سفید مات) از ۴۲ نمونه خاک جنگلی شهرستان‌های مختلف استان گلستان، تعداد ۱۶۰ جدایه انتخاب و گزینش گردید. پس از رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی‌بلو، شناسایی جدایه‌ها بر مبنای شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) انجام شد. شناسایی میکروسکوپی باکتری Bt از طریق میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (مدل Xion Inverso ساخت شرکت Euromex هلند) انجام شد، تصاویر نشان داد که کریستال‌ها به رنگ تیره و اسپورها به رنگ روشن بودند (شکل ۳). به این ترتیب در ۳۱/۲۵ درصد از جدایه‌ها، پروتئین‌های کریستالی مشاهده شدند (جدول ۲).



شکل ۳- نمایی از اسپور (S)، کلاهک (Cap) و کریستال (C) باکتری Bt مشاهده شده زیر میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی × ۱۰۰)

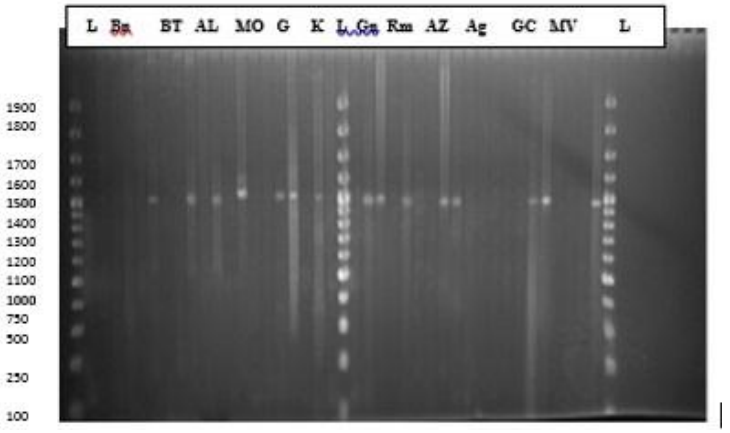
Fig. 3. View of Spores (S), Cap, and Crystal (C) of the Bt observed under the optical contrast microscope (magnification × 100)

بررسی ساختار ژنی جدایه‌های باکتری Bt

از آن جا که ژن‌های تولیدکننده پروتئین کریستالی روی DNA پلاسمیدی باکتری Bt قرار دارند، با انجام تغییرات جزئی بهترین روش استخراج DNA برای این باکتری بهینه‌سازی شد و به جهت اطمینان بیشتر، DNA هر ۵۰ جدایه تولیدکننده کریستال به همراه ۲۰ جدایه تولید کننده اسپور و کلاهک استخراج و برای انجام آزمایشات بعدی آماده گردید.

شناسایی جدایه‌های دارای ژن‌های *Cry* و *Vip*

پس از بهینه‌سازی و انجام مراحل استخراج DNA، این جدایه‌ها با استفاده از آغازگرها تحت واکنش PCR قرار گرفتند. از بین آن‌ها ۱۲ جدایه حاوی ژن‌ها در اندازه‌های مورد انتظار (۱۶۰۰bp –۱۵۰۰) بودند و سایر جدایه‌ها نیز قطعات کوچک‌تر (حدود ۶۰۰bp- ۵۰۰) تولید کردند که نیازمند توالی‌یابی و بررسی‌های بیش‌تر است (شکل ۴). اسامی مناطق نمونه‌برداری و نام جدایه‌ها در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۴- تکثیر اختصاصی ژن‌های *Cry* و *Vip* در جدایه‌های بومی باکتری Bt

Fig. 4. Specific amplification of *Cry* and *Vip* genes in native *Bacillus thuringiensis* isolates.
L: Ladder (Molecular weight marker)
The native Bt strains (Bn, BT, AL, MO, G, K, Gn, Rm, AZ, Ag, GC, MV, respectively).

جدول ۲- توزیع جدایه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* تولیدکننده اسپور، کلاهک و کریستال در خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان.

Table 2. Distribution of Spore, Cap and Crystal forming isolates of *Bacillus thuringiensis* in forest soil samples of Golestan Province.

تعداد کل جدایه‌ها	تعداد جدایه‌های تولید کننده اسپور	تعداد جدایه‌های تولیدکننده اسپور و کلاهک	تعداد جدایه‌های تولیدکننده کریستال	درصد جدایه‌های تولیدکننده کریستال
Number of Total isolates	Number of spore forming isolates	Number of spore and Cap Forming isolates	Number of crystal Forming isolates	Percentage of crystal Forming isolates
160	90	20	50	31.25

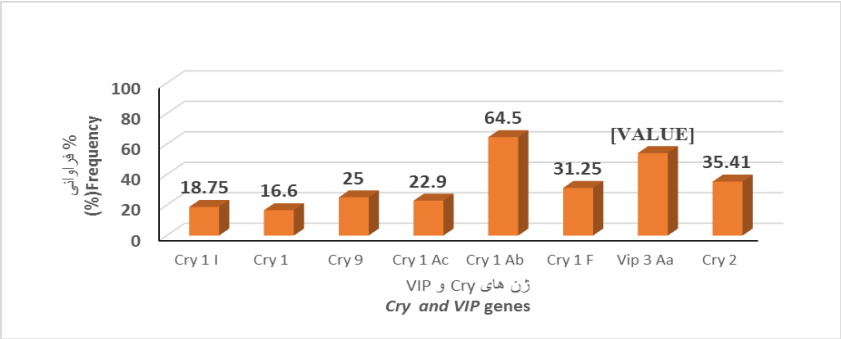
بررسی زیرگروه‌های ژنی

پتانسیل سمیت جدایه‌های Bt به نوع و زیر گروه‌های ژن‌های *Cry* و *Vip* آن وابسته است (Apaydin *et al*., 2005). در جدول ۴ تنوع ژنی این ۱۲جدایه بر اساس الگوهای باندی به‌دست آمده ارائه شده است. در این بررسی، ژن‌های *Cry1Ab* و *Cry 2* و *Cry1F* در همه جدایه‌ها یافت شدند، اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1I* و *Cry1Ac* فراوانی بسیار کم داشتند و یا در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشدند. در برخی از جدایه‌ها ژن‌های *Cry1F*، *Cry1I* و *Cry1Ac* در اندازه‌های متفاوت از آن‌چه

مورد انتظار بود، تکثیر شدند. تولید مداوم و تکثیر مناسب این قطعات متفاوت در جدایه‌های مورد نظر نشان دهنده اندازه متفاوت این ژن‌ها در این جدایه‌های بومی می‌باشد. توالی‌یابی این قطعات و مقایسه آن‌ها با توالی‌های استاندارد، دلیل اختلاف در طول قطعات تکثیری را مشخص خواهد کرد. در برآورد فراوانی هر یک از این ژن‌ها (شکل ۵)، تکثیر مثبت بدون در نظر گرفتن اندازه قطعه مبنا قرار گرفت.

نیمرخ‌های پروفایل مختلف ژن

آگاهی از نیمرخ‌های ژنی مختلف در باکتری Bt می‌تواند احتمال به‌کارگیری آن‌ها را در برابر طیف وسیعی از آفات افزایش داده و موجب کارآیی بیشتر برنامه‌های مبتنی برکنترل بیولوژیک شود (گرایلی و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج تحقیق کنونی نشان داد که این ۱۲ جدایه دارای ۱۲ نوع نیمرخ ژنی متفاوت هستند. جدایه Co (کمیشان) با دو ژن، حداقل تنوع را دارا بود (جدول ۳). سایر جدایه‌ها دارای تعداد بیش‌تری از ژن‌ها بودند. متنوع‌ترین نیمرخ ژنی در این اکوسیستم با ۱۰ زیر مجموعه ژنی در جدایه‌های Mo (مینودشت) و K (کردکوی) مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵- نمودار درصد فراوانی ژن‌های *Cry* و *Vip* در جدایه‌های Bt به‌دست آمده از خاک‌های جنگلی استان گلستان

Fig. 5. Diagram of *Cry* and *Vip* genes frequency in detected Bt isolates from the forest soil samples of Golestan Province.

فراوانی ژن‌های مورد نظر در جدایه‌های مختلف Bt متفاوت بود به‌طوری‌که برخی از جدایه‌ها حاوی چند ژن بوده و فراوانی بیش‌تری داشتند و در برخی دیگر هیچ ژنی وجود نداشته و یا دارای فراوانی کم بوده است. بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن *Cry1Ab* با ۶۴/۵ درصد و کم‌ترین فراوانی مربوط به ژن *Cry1* با ۱۶/۶ درصد بوده است (شکل ۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که خاک نواحی جنگلی، منبعی مناسب برای یافتن جدایه‌های مؤثر باکتری Bt و کنترل بیولوژیک آفات است. می‌توان در تحقیقات بعدی از جدایه‌های جدید شناسایی شده باکتری Bt و ژن‌های توکسین مؤثر آن‌ها، برای تولید حشره‌کش‌های بیولوژیک جدید به منظور کاهش مقاومت آفات و کاهش آلودگی محیط زیست استفاده نمود.

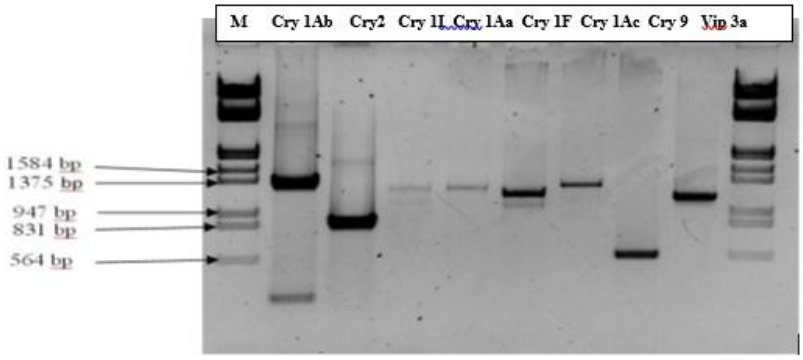
بحث

پس از معرفی و توصیف روش PCR برای شناسایی ژن‌های *Cry* باکتری Bt، این روش را می‌توان به‌عنوان یک ابزار مولکولی برای پیش‌بینی فعالیت حشره‌کشی جدایه‌های Bt پیشنهاد نمود. از این ابزار برای تکثیر بخش‌های خاصی از DNA و همچنین تعیین وجود و یا عدم وجود یک ژن هدف استفاده می‌شود (Carrozi *et al*., 1991).

جدول ۳- نیمرخ ژنی در جدایه‌های باکتری Bt جداسازی شده از خاک‌های مناطق جنگلی استان گلستان

Table 3. Gene profiles in isolated Bt strains from the forest soil samples of Golestan province

نام جدایه Isolates	Sampling location	منطقه نمونه‌برداری	Profiles	نیمرخ‌ها
Mo	Minoodasht	مینودشت	*Cry1Ac – Cry1Ab – Cry1Aa – Cry1I – Cry1F – Cry2 – Cry9 – Vip* 3Aa	
K	Kordkooy	کردکوی	*Cry1Ac – Cry1Ab – Cry1Aa – Cry1I – Cry1F – Cry2 – Cry9*	
Bn	Bandargaz	بندرگز	*Cry1Ab – Cry1Aa– Cry1F – Cry2 – Cry9 – Vip3Aa*	
Ag	Agh-Ghala	آق قلا	*Cry1Ac – Cry1Ab – Cry1Aa – Cry1I*	
BT	Bandar Torkman	بندرترکمن	*Cry1F – Cry2 – Cry9 – Vip3Aa*	
G	Gorgan	گرگان	*Cry1Ab – Cry1Aa – Cry1I – Cry1F*	
Al	Aliabad	علی آباد	*Cry1Ac – Cry1Ab – Cry1F – Cry2 – Cry 9*	
Gn	Gonbad	گنبد	*Cry1F – Cry2 – Cry9 – Vip 3Aa – Cry1Ab*	
Rm	Ramian	رامیان	*Cry2 – Cry 9 – Vip 3Aa – Cry1Ab*	
Az	Azadshahr	آزادشهر	*Cry2 – Cry9 – Vip 3Aa- Cry1F – Cry1Ab*	
Gc	Galikesh	گالیکش	*Cry1Ab – Cry9 – Cry1F – Cry2*	
Mv	Maraveh Tappeh	مراوه‌تپه	*Cry1Ab – Cry1Aa – Cry1I*	



شکل ۶- نیمرخ ژنی جدایه Mo از باکتری Bt. (M : نشانگر مولکولی وزنی)

Fig. 6. Gene profile for Mo isolate of Bt. (M: Molecular Weight Marker).

جدول ۴- ساختار ژنی در جدایه‌های بومی Bt جداسازی شده از خاک‌های جنگلی استان گلستان

Table 4. Characterization of genes in Bt isolates from the forest soil samples of Golestan province

Genes ژن‌ها	Isolates جدایه‌ها											
	Mv	**Gc**	**Az**	**Rm**	**Go**	**A1**	**G**	**BT**	**Ag**	**Bn**	**K**	**Mo**
Cry1Ac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cry1Ab	+	±	-	+	+	+	+	+	±	±	+	+
Cry1Aa	-	+	±	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Cry1I	±	+	-	-	-	-	±	-	-	+	+	±
Cry1F	-	-	+	±	±	±	-	-	+	+	-	+
Cry2	+	+	±	-	-	-	+	±	+	+	+	+
Cry9	±	-	+	+	+	+	±	-	-	-	+	+
Vip3Aa	-	±	±	-	-	-	-	-	±	+	+	+

علائم - ، + و ± به ترتیب به معنی: بدون تکثیر، تکثیر ژن در اندازه مورد انتظار و تکثیر ژن در اندازه غیر قابل انتظار

The marks -, + and ± mean: no amplification, amplifying the expected fragment and amplifying unexpected fragment, respectively

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، روشی سریع، دقیق و مطمئن برای ردیابی ژن‌های مختلف در باکتری Bt است. روش‌های سنتی زیست‌سنجی حشرات نیازمند پرورش تعداد زیادی حشره بوده و انجام تیمارهای مختلف نیاز به زمان زیادی دارد. از این‌رو، شناسایی مولکولی جدایه‌های موثر می‌تواند به خوبی جایگزین روش‌های سنتی شود. همچنین با این روش می‌توان از ساختار ژن‌های *Cry* و *Vip* جدایه‌های بومی آگاهی یافت و قابلیت حشره‌کشی آن‌ها را پیش‌بینی کرد (Parcar and Juarez-perez, 2003). کیم و همکاران، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ۹ ژن *Cry1* را در ۱۶۳ جدایه Bt جداسازی شده از انبار غلات مورد بررسی قرار دادند. ژن*Cry 1Ab* با ۴۷٪ دارای بیش‌ترین و ژن‌های *Cry1G* با ۲٪ و *Cry1E* با ۱٪ کم‌ترین فراوانی بودند (Kim *et al*., 1998). در تحقیق دیگر، از ۷۰ جدایه باکتری Bt ، ۳۴ جدایه (۴۹٪) دارای ژن *Cry1* بودند. ژن *Cry1I* با ۱۰۰٪ دارای بیش‌ترین فراوانی بوده و ژن‌های*Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* اصلاً یافت نشدند. همچنین ژن‌های *Cry1C*، *Cry1E* و *Cry1J* در برخی از جدایه‌ها در اندازه‌های غیر قابل انتظار مشاهده شدند (Seifinejad *et al*., 2008). در تحقیقی در کشور هند، با بررسی جدایه‌های Bt موثر روی حشرات راسته‌های بال‌پولک‌داران و سخت‌بال‌پوشان، ژن *Cry1I* با بیش‌ترین فراوانی (۷۰/۵ ٪) مشاهده شد (Pooja *et al*., 2013). جستجو برای یافتن جدایه‌های Bt از منابعی به جز خاک نیز نتایج متغیری به همراه داشته است. به‌طوری‌که در پژوهشی، ۱۰ژن زیرمجموعه *Cry1* را در ۳۶ جدایه به‌دست آمده از انبار غلات شناسایی نمودند. ژن‌های *Cry1E* (۱۰۰٪)، *Cry1Aa* (۹۵٪)، *Cry1Ac* (۹۱٪) بیش‌ترین فراوانی و ژن‌های *Cry1Ab* (۷٪)، *Cry1d* (۶٪) و *Cry1B* (۳٪) کم‌ترین فراوانی را داشتند (Apaydin *et al*., 2005).

در کشور سوریه از ۴۰ جدایه Bt جداسازی شده از لاروهای آلوده در تمامی جدایه‌ها، ژن *Cry1Aa* و *Cry1Ac* مشاهده شدند. پس از آن، ژن‌های *Cry1I* (۳۷ جدایه) و *Cry1Ab* (۳۴ جدایه) با بیش‌ترین فراوانی و ژن *Cry1D* (۴ جدایه) با کم‌ترین فراوانی مشاهده گردید (Martinez *et al*., 2005). احتمالاً تفاوت‌های مشاهده شده در محتویات ژنتیکی ژن‌های *Cry* و *Vip* ناشی از تفاوت اکولوژیک مناطق مختلف از جمله پوشش گیاهی، تنوع حشرات میزبان و تنوع فون خاک در نواحی متفاوت جغرافیایی است (Martinez *et al*., 2002). نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها که طی آن، تبادل ژنتیکی بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نوترکیب با محتویات ژنتیکی جدید می‌شود نیز مورد توجه است (Makhdoom, 1998).

علی رغم تفاوت‌ها و تنوعی که در نتایج دیده شد، فراوانی برخی ژن‌ها در منابع و نواحی مختلف تقریباً مشابه بود. در تحقیق کنونی، ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1I* و *Cry1Ac* فراوانی بسیار کم داشتند و یا در هیچ جدایه‌ای یافت نشدند. این ژن‌ها در برخی از مطالعات کم‌تر مشاهده شد و یا در برخی اصلاً مشاهده نشدند (Kim *et al*., 1998; Martinez *et al*., 2005). با دسته‌بندی نیمرخ‌های ژنی در بین ۱۴جدایه یافت شده در تحقیق کنونی، ۱۲ نوع نیمرخ ژنی مختلف از ۳ تا ۸ ژن مشاهده شد که متنوع‌ترین نیمرخ دارای ۸ ژن بود. در حال‌یکه در پژوهش مشابه دیگری که در ایران انجام شد، از ۳۴ جدایه محتوی ژن *Cry1*، ۲۲ نیمرخ ژنی مختلف از ۱ تا ۹ ژن مشاهده شد. متنوع‌ترین نیمرخ ژنی دارای ۹ ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*،*Cry 1F* و *Cry1I* بود که تنها در یک جدایه (۲/۹ ٪) ردیابی شدند (Seifinejad *et al*., 2008).

از ۳۱ جدایه محتوی ژن *Cry1*، تنها ۱۳ نیمرخ ژنی مختلف (۴۲٪) و از ۱۸ جدایه دارای ژن *Cry1*، چهار نوع نیمرخ ژنی مختلف به‌دست آمد که متنوع‌ترین توالی با پنج ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1B* و *Cry1D* بود که در ۱۴ جدایه (۷۷/۷ ٪) مشاهده شد (Carrozi *et al*., 1991). در تحقیقی در کشور ترکیه، از ۳۶ جدایه دارای ژن *Cry1*، ۱۸ نیمرخ ژنی مختلف (از ۲ تا ۹ ژن) ردیابی نمودند که متنوع‌ترین آن با ۹ ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*، *Cry1F* و *Cry1G* مشاهده گردید (Apaydin *et al*., 2005).

نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های بومی Bt جداسازی شده از خاک‌های جنگلی استان گلستان از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار هستند. از آنجا که خاک‌های جنگلی تنوع زیستی بالایی دارند، انتظار می‌رفت که جدایه‌های بسیار متعدد و بیش‌تری از باکتری Bt یافت شوند. علاوه بر این، وجود چندین نیمرخ ژنی در جدایه‌ها (بین ۳ تا ۸ زیرمجموعه مربوط به *Cry1*)، نشان‌دهنده قابلیت مناسب این جدایه‌ها به عنوان حشره‌کش‌های بیولوژیک بومی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) می‌باشد.

منابع References

گرایلی مرادی، ف.، محمدی شریف، م.، هادی‌زاده، ع. ر. و بابائی‌زاد، و. ۱۳۹۳. شناسایی ساختار ژنی سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های مناطق جنگلی استان مازندران. مجله فناوری زیستی در کشاورزی ۱۳(۱): ۷۶-۶۷.

Apaydin, O., Yenidunya, A., Harsa, S. and Gunes, H. 2005. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 285-292.

Aramideh, SH., Safaralizadeh, M. H., Pourmirza, A. A., Rezazadeh Bari, M., Keshavarzi, M. and Mohseniazar, M. 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from west Azerbaijan province of Iran. African Journal of Microbiology Research 4: 1224-1229.

Carrozi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. and Koziel, M. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Chain Reaction product profiles. Applied and Environmental Microbiology 57: 3057- 3061.

Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A. F., Harsa, S. and Gunes, H. 2008. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. Journal of Applied Microbiology 104: 515-525.

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

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

Juarez- perez, V. M., Ferrandis, M. D. and Frutus, R. 1997. PCR- based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* Cry genes. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 2997-3002.

Kaelin, P., Morel, P. and Gaani, F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). Applied and Environmental Microbiology 60: 19-25.

Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, Y. M. and Kang, S. K. 1998. Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. Current microbiology 37: 195-200.

Makhdoom, R. 1998. Cloning and Sequencing of the delta endotoxin gene from isolated *Bacillus thuringiensis* toxic against spotted bollworm. Ph. D. Thesis. University of the Punjab. 16 p.

Martinez, C., Ibarra, J. E and Caballero, P. 2005. Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 91-97.

Martínez, C., Caballero, P. 2002. Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. Journal of Applied Microbiology 92: 745-752.

Mohammedi, S., Bala Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D. and Valergo, J. R. 2006. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process Biochemistry 41: 829-835.

Porcar, M. and Juarez-perez, V. 2003. PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews 26: 419-432.

Pooja, A. S., Krishnaraj, P. U. and Prashanthi, S. K. 2013. Profile of cry from native *Bacillus thuringiensis* isolates and expression of *cry1I*. African Journal of Biotechnology 12: 3545-3562.

Rolle, R. L., Ejiofor, A. and Johnson, T. L. 2005. Determination of the plasmid size and location of δ-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. African Journal of Biotechnology 4: 580-585.

Salehi Jouzani, G., Pourjan Abad, A., Seifinejad, A., Marzban, R., Kariman, K. and Maleki, B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from diverent ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 83-94.

Seifinejad, A., Salehi Jouzani, G. R. and Abdmishani, C. 2008. Characterization of Lepideptera– active *Cry* and *Vip* genes in Iranian Bt strain collection. Biological Control 44: 216-226.

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.

Some of the genetic characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains isolated from forest soil samples of Golestan province

M. Shazdehahmadi[1*], A. sajjadi[1] and Z. Shahadati Moghadam[1]

Received: 16 Dec., 2018 Accepted: 30 Apr. 2019

ABSTRACT

Native strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt) were isolated from forest soils of the different areas of Golestan Province and *Cry* and *Vip* genes, responsible of the effective toxin, were monitored. From a total of 42 soil samples examined through selective sodium acetate detention, 160 Bt isolates were separated. After planting the colonies, specific staining and microscopic identification were observed in 40% of isolates crystalline proteins that are toxic to many insects. Molecular study showed that in 12 isolates, gene *Cry1* existed. Genetic structure tests for presence of 3 gene *Cry1A* (including *Cry1Ac*, *Cry1Ab*, *Cry1Aa*) and genes *Cry1I*, *Cry1F*, *Cry2*, *Cry 9*, *Vip3Aa* was carried out using the 8 pair of specific primers. Genes *Cry1Ab*, *Cry2*, *Cry F* were observed in all isolates, but the genes of *Cry1Aa*, *Cry1I*, *Cry1Ac* had very low frequency (Lower than 20%) or not found in any of the isolates. The results of this research could be very useful for tracking native Bt isolates that contain effective crystalline proteins for insects.

Key words: Crystalline protein, *Cry* and *Vip* genes, *Bacillus thuringiensis*, Molecular identification

1. Researcher, Department of Plant Pathology, Tirtash Research and Education Center, Behshahr, Iran.
***Corresponding author**: noshinshazdeahmadi@yahoo.com