

بررسی تفاوت بیولوژیک دو جدایه ایرانی *Bacillus thuringiensis* از استان های یزد و بوشهر بر روی کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* (Hubner)

Biological differences between Iranian isolates *Bacillus thuringiensis* from Yazd and Booshehr provinces on *Helicoverpa armigera* (Hubner)

سمانه خیری^۱، محمدرضا رضایانه^۲، محمود شجاعی^۱، غلامرضا صالحی جوزانی^۳ و ندا خردپیر^۴*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۲۸

چکیده

باکتری (*Bacillus thuringiensis*) به عنوان یکی از مهم ترین باکتری های بیماری زا از خانواده Bacillaceae بوده که به عنوان جایگزین عملی سموم شیمیایی به صورت عامل بیولوژیک مؤثر در کنترل بسیاری از حشرات به کار می رود. پتانسیل های متفاوت این باکتری بر روی حشرات مختلف ناشی از تنوع سروتایپ ها و نیز تنوع سویه ها می باشد. کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) آفت خطرناک پنبه و دارای میزبان های متعدد است. در این تحقیق میزان مرگ و میر لاروهای کرم قوزه بر اثر دو جدایه بومی Bt که از مزارع استان های یزد (YD5) و بوشهر (BR4) جداسازی شده بودند، برآورد گردید. سپس مقدار LC50 هر جدایه برای لاروهای نئونات محاسبه شد. از جدایه تجاری Dipel به عنوان شاهد آزمایش استفاده گردید. تحت آزمایش زیست سنجی LC50 برای جدایه Dipel، ۶۸/۲۸۶۴ اسپور بر هر میلی لیتر، برای جدایه YD5، ۴۸×۱۰^۶ اسپور بر هر میلی لیتر و برای جدایه BR4، ۷۷×۱۰^{۱۲} اسپور بر هر میلی لیتر نشان دهنده میزان کارایی این ایزوله ها بود. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه YD5 از کارایی نسبتاً بالاتری در مقایسه با دیگر جدایه ایرانی برخوردار است.

واژگان کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، جدایه BR4، بوشهر، جدایه YD5، یزد، زیست سنجی

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

۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، 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

با افزایش جمعیت و محدود شدن اراضی تحت کشت، توجه بشر بیش‌تر به سمت روش‌های به‌زرایی معطوف گشته است. ایجاد نسل مقاوم به سموم در میان جمعیت آفات، همچنین مسئله باقیمانده سموم و اثرات مخرب زیست محیطی، ایجاد آفات ثانویه و از بین رفتن دشمنان طبیعی از معضلات جدی استفاده از مبارزه شیمیایی محسوب می‌شوند. در چنین شرایطی روش‌های متعددی نظیر کنترل بیولوژیک به عنوان یکی از طرق مهم مبارزه در مدیریت تلفیقی آفات مورد توجه است. به‌کارگیری عوامل بیماری‌گر یا فرآورده‌های آن‌ها برای کنترل جمعیت آفات در واقع بخشی از مبارزه بیولوژیک است که در آن از میکروارگانیسم‌ها برای کاهش جمعیت آفات استفاده می‌شود.

Ishiwata (1901) عامل بیماری Sototo را در کرم ابریشم که باکتری *Bacillus* بود کشف کرد و آن را *Bacillus sotto* نام نهاد. Berliner (1915) باسیلی را از لاروهای شب پره آرد جدا کرد و بر اساس شهر محل جمع‌آوری باکتری، آن را *Bacillus thuringiensis* (Bt) نامید.

Angus (۱۹۵۴) تاثیر اندوتوکسین Bt را به اثبات رسانید و کریستال را عامل اصلی از بین بردن لارو حشرات معرفی کرد. در سال ۱۹۵۸ اولین محصول تجاری Bt در آمریکا به بازار عرضه شد. Bt در سال ۱۹۶۱ به عنوان کنترل کننده حشرات در EPA (Environmental Protection Agency) ثبت گردید. تا سال ۱۹۷۷ تنها ۱۳ زیرگونه از Bt شناسایی شده بود، که تمامی این ۱۳ زیرگونه فقط روی گونه‌های مشخصی از بال‌پولکداران مؤثر بودند. اولین زیرگونه‌های مؤثر روی دوبالان در سال ۱۹۷۷ کشف شدند (Goldberg et al., 1978) و اولین زیر گونه‌های مؤثر روی سخت‌بال‌پوشان در سال ۱۹۸۳ شناسایی شدند. استفاده از Bt به‌علت مقاومت حشرات به آفت‌کش‌های سنتتیک از سال ۱۹۸۰ افزایش یافت (Krieg et al., 1983). Bt به صورت طبیعی در تمام نقاط جهان وجود دارد و ایزوله‌های فراوانی از آن جداسازی شده است که مهم‌ترین و کاربردی‌ترین آن زیرگونه *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (3a3b) می‌باشد که اولین بار توسط Kurstak (1982) از لاروهای بیمار شب پره آرد *Angasta kuehniella* جداسازی شد و بعد از آن از لاروهای بیمار کرم سرخ پنبه به‌دست آمد و به‌عنوان استرین HD-1 نام‌گذاری گردید (Dulmage and Martinez, 1973). در حال حاضر باکتری Bt در اغلب کشورهای جهان تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد.

Ferro and Gelernter (1989) سمیت استرین‌های جدیدی از Bt را بر روی سوسک کلرادو سیب‌زمینی مطالعه کردند. فرو و همکاران اثر کشندگی دو زیرگونه Bt به نام‌های *sandiego* و *tenebrionis* را بر روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی بررسی کردند (Ferro et al. 1991). در تحقیقات دیگر، فعالیت بیماری‌زایی جدایه‌های Bt بومی علیه لاروهای دوبالان بر اساس آزمایشات زیست‌سنجی مورد بررسی قرار گرفت (Lonc et al., 2001). کارایی Bt وارپته فرموله شده *israelensis* در کنترل پشه‌ها در استرالیا مطالعه شد (Russel et al., 2003).

در ایران نیز مواد بیولوژیک بر اساس Bt با نام‌های تجاری مختلفی روی آفات گوناگون مورد بررسی قرار گرفته‌اند. از جمله کارهای انجام شده می‌توان به بررسی‌های صفرعلیزاده (۱۳۵۴-۱۳۵۶) روی آفات بلوط، ایزدیار و همکاران (۱۳۷۴)، جوانمقدم و حیدری (۱۳۷۴) و حیدری (۱۳۷۴) بر روی کرم ابریشم‌باف ناجور اشاره کرد. مرزبان (۱۳۷۶) کنترل بیولوژیکی شب پره هندی در خشکبار بوسيله باکتری Bt را مورد بررسی قرار داد. ایزدیار (۱۳۸۱) جدایه بومی Bt روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتا‌گروتوکسین در آن‌ها را مورد مطالعه قرار داد. برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج در راستای کاهش مصرف سموم شیمیایی از باکتری *B. thuringiensis* var. *kurstaki* استفاده شد (کریمی و همکاران، ۱۳۹۱).

B. thuringiensis یک باکتری گرم مثبت به ابعاد $۳-۴ \times ۱-۱/۲$ میکرون، با اسپور نیمه انتهایی و بیضی شکل می‌باشد. این باکتری با نام معمولی Bt، میله‌ای شکل، تولیدکننده اسپور متحرک با تاژک محیطی است. سلول رویشی وقتی شروع به تولید اسپور می‌کند اسپورانژیوم نامیده می‌شود. همزمان با تشکیل اسپور در داخل اسپورانژیوم بلورهای سمی یا کریستال تولید می‌شود. هنگامی که اسپورولاسیون به اتمام رسید، اسپورانژیوم لیز شده و اسپور و کریستال به محیط اطراف رها می‌شود (Lianshen, 1994). Heimle (1967) سموم قوی و شناخته شده

Bt را تشخیص و توسعه داد و حروف الفبای یونانی را برای نام گذاری توکسین‌ها پیشنهاد نمود. این سموم شامل: آلفاگروتوکسین، بتاگروتوکسین، گاماگروتوکسین، بتاندوتوکسین و دلتاندوتوکسین می‌باشند. طی دهه‌های گذشته تعداد زیادی از زیر گونه‌های Bt شناسایی شده‌اند. این زیرگونه‌ها تحت عناوین مختلفی نظیر Serotypes, Serovars, Strains, Crystovars و Pathovars مطرح شده‌اند. زیرگونه‌های Bt با روش‌های مختلفی از جمله تست‌های بیوشیمیایی، آنتی ژن تاژک‌ها، آنتی ژن کریستال یا پاراسپورال بادی، تولید استراز، تولید آنتی بیوتیک، آنزیم‌ها، فاژها و گروه‌بندی لکتین متمایز می‌شوند. طبقه‌بندی زیرگونه‌های Bt براساس سروتایپ-H یا آنتی ژن تاژک در اوایل دهه ۱۹۶۰ انجام شد (de Barjac & Bonnefoi, 1972). استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، مکمل روش طبقه‌بندی سروتایپی بود (de Barjac, 1981). تا اواخر سال ۱۹۹۸ بیش از ۶۷ زیرگونه بر اساس H-serovar تاژکی شناسایی شد (Bajwa and Kogan, 2001).

کرم قوزه یا غنچه پنبه *Helicoverpa armigera* Hubner در ایران اولین بار توسط افشار (۱۳۱۷) گزارش شده است. این حشره یکی از آفات مهم و پلی‌فاژ پنبه محسوب می‌شود و بیش از ۷۰ گونه میزبان برای آن گزارش شده است. کرم قوزه در اکثر مناطق ایران و بالخصوص در نواحی پنبه‌کاری شمال کشور شیوع دارد. با توجه به سطح زیر کشت پنبه و همچنین گوجه‌فرنگی و اهمیت اقتصادی این محصولات، استفاده از Bt می‌تواند یک راه مبارزه مناسب در کنترل تلفیقی این آفت به‌شمار آید. هدف از این تحقیق ارزیابی جدایه‌های بومی Bt جمع‌آوری شده از استان‌های یزد و بوشهر روی کرم قوزه پنبه می‌باشد. داده‌هایی که از این پروژه به‌دست آمد، علاوه بر تعیین کارایی این ایزوله‌ها در تأثیر روی آفت هدف، می‌تواند در ارتباط با مطالعات مولکولی راهگشا باشد و بتوان از این پس بر اساس 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 بررسی نشده‌اند و صرفاً با توجه به روند روبه رشد استفاده از سموم میکروبی در کنترل آفات، این 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 دو مرحله از مزارع گوجه‌فرنگی واقع در گرگان انجام گرفت. لاروها از گوجه‌های آلوده جداسازی و درون قوطی فیلم حاوی غذای مصنوعی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. شفیره‌ها نیز به ظروف حاوی خاک اره استریل انتقال داده شد. کلیه مراحل رشدی آفت در اتاق پرورش با درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت انجام گرفت. برای پرورش کرم قوزه پنبه به کمک غذای مصنوعی از مواد غذایی و مواد نگهدارنده قابل دسترس به شرح زیر استفاده شد: لوبیا چشم بلبلی (خیسانده شده در آب به مدت ۲۴ ساعت)، مخمر نانویی (۳۵ گرم)، پودر جوانه گندم (۳۰ گرم)، اسید سوربیک (۱/۱ گرم)، اسید اسکوربیک (ویتامین C) (۳/۵ گرم)، متیل پارا هیدروکسی بنزوات (نیپازین) (۲/۲ گرم)، آگار-آگار (۱۴ گرم)، روغن آفتابگردان (بدون آنتی اکسیدانت) (۵ میلی لیتر) و فرمالدئید ۳۷٪ (۲/۵ میلی لیتر).

ابتدا محیط کشت آگار-آگار همراه با ۷۰۰ ml آب مقطر درون ارلن ریخته و در اتوکلاو با درجه حرارت 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 همراه با نیپازین 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 مجدداً به مدت یک دقیقه بهم زده شد. مواد غذایی زیر هود در پتری‌های استریل به قطر ۱۵ سانتی‌متر ریخته شده و به منظور استفاده برای تغذیه حشرات در یخچال نگهداری شدند.

پروانه‌ها در دسته‌های ۱۰ تایی (۵ نر + ۵ ماده) در استوانه‌های پلاستیکی ۱۷×۳۵ cm با دیواره پوشیده با کاغذ جذب‌کننده رطوبت قرار داده شدند. پتری حاوی آب-عسل ۱۰٪ به منظور تغذیه افراد بالغ درون استوانه‌ها در نظر

گرفته شد. نوارهای حاوی تخم کرم غوزه در ظروف بستنی با درب بدون منفذ همراه با یک قطعه پنبه مرطوب قرار داده شدند. پس از تفریح تخم‌ها، لاروهای نئونات با قلم موی ظریف به صورت دسته‌های ۷۰-۶۰ تایی در ظروف بستنی با درب محکم قرار گرفتند. لاروها بعد از گذشت ۴ روز به صورت 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 مینای انتخاب جدایه‌ها، وجود ژن‌های مؤثر بر راسته بال‌پولکداران (cry 1) بر اساس تحقیقات انجام شده قبلی (صیفی، ۱۳۸۶) بود. به این ترتیب جدایه‌های YD5 (جدا شده از خاک مزرعه یزد)، BR4 (جدا شده از خاک مزرعه گلزا، بوشهر) و فرآورده تجاری Dipel (*B. thuringiensis* var. *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 کشت N.A. (Nutrient Agar) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی از روی محیط بوسیله لوپ استریل جمع‌آوری شده و به ارلن‌های حاوی محیط کشت Lb Broth قرار گرفتند (Sambrook et al. 1989). ارلن در شیکر با دور ۱۶۰ rpm قرار گرفته و سپس در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس گذاشته شد. 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 سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. مایع رویی جداسازی شده و باقیمانده با ۲ ml کلریدسدیم ۰/۱ مولار مخلوط شد و در دور ۳۰۰۰ با دمای ۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی جداسازی شده و ۲ ml آب مقطر استریل به لوله اضافه و سانتریفوژ شد. نهایتاً اسپور-کریستال ته نشست را با سمپلر خارج و با ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل کاملاً مخلوط و در فریزر ۱۳- درجه نگهداری شد (Bird and Akhurst, 2007).

برای تهیه غلظت‌ها، ابتدا ۵ لوله آزمایش استریل برای هر سویه شماره‌گذاری (۱ تا ۵) شد. در لوله اول ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و ۱ میلی‌لیتر از استوک اسپور-کریستال به آن اضافه 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 منظور تهیه غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر) باکتری، ۲۰ میلی‌گرم از محلول استوک BSA (Bovin Serum Albumin) را با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و همراه با 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 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 بود، به عنوان رقت مبنا برای شمارش

کلنی هر ایزوله در نظر گرفته شد. برای این غلظت مبنای 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 به دست 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 نوترینت آگار 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 در داخل باکتری جای داشتند. بعد از ۷۲ ساعت، تعداد کمی از باکتری‌ها لیز شده و اسپور-کریستال خود را در داخل محیط کشت رها کردند. 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، بر روی لام 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 شده و سپس با آب مقطر شسته شد. در نهایت نمونه در مجاورت هوا با میکروسکوپ مشاهده شد.

زیست‌سنجی جدایه‌های بومی Bt روی کرم فوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*)

برای زیست‌سنجی و تعیین LC₅₀، از غلظت‌های آماده شده استفاده گردید. ۵ غلظت از هر جدایه و برای هر غلظت ۲۵ قوطی فیلم در نظر گرفته شد و ۳ تکرار زمانی نیز انجام پذیرفت. بدین ترتیب برای ۵ غلظت و شاهد در هر جدایه ۳۹۰ قوطی فیلم عکاسی مهیا و شماره‌گذاری گردید.

در آزمایش زیست‌سنجی از روش آمیختن باکتری با غذای مصنوعی استفاده شد (Bird and Akhurst, 2007)؛ Dulmage and Martinez, 1973). بدین ترتیب که به میزان ۱۰٪ از آب غذای مصنوعی کاسته و مخلوط باکتری به نسبت ۱:۹ به مخلوط غذای مصنوعی اضافه شد. از هر غلظت باکتری تهیه شده به میزان ۶/۶ میلی‌لیتر به ۵۰ میلی‌لیتر غذای مصنوعی اضافه و کاملاً مخلوط گردید. دمای مخلوط غذای مصنوعی در این مرحله ۵۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر غذای مصنوعی حاوی اسپور و کریستال در قوطی فیلم ریخته شد؛ پس از ۳۰ دقیقه غذا کاملاً به حالت جامد تبدیل شد. 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 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* var. *Kurstaki* می‌باشد که در این آزمایشات نیز از همین باکتری به صورت فرآورده تجاری دایبل ساخت کشور هلند استفاده گردید. آزمایش زیست‌سنجی ۳ بار تکرار گردید و اطلاعات به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار Probit قرار گرفت. مقدار LC₅₀ ارزیابی و شاخص‌های آماری مربوطه مشخص گردید.

نتایج

وجود اسپور و کریستال در جدایه‌های ایرانی با تهیه اسلاید و رنگ‌آمیزی گرم مشخص و تأیید گردید.

در جدول ۱ برآورد تعداد اسپور در ایزوله‌های مختلف باکتری حاصل از مزارع دو شهرستان یزد و بوشهر به همراه ایزوله شاهد آورده شده است. ارزیابی بیولوژیک جدایه‌های باکتری Bt به صورت زیست‌سنجی با روش LC50 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 LC50، محدوده اطمینان و عیار 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 (رضاپناه، ۱۳۸۰). لذا تمامی خطوط پروبیت در سطح احتمال ۱٪ با نقاط مشاهده شده برازش دارند. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تراکم اسپورهای باکتری در جدایه YD5 در مقایسه با دیگر جدایه‌های باکتری حاصل از مزارع بوشهر در سطح نسبتاً بالاتری قرار داشته و در عین حال نتایج حاصل از مرگ و میر لاروها با استفاده از این جدایه بسیار به راندمان تلفات فرمولاسیون تجاری Dipel نزدیک است که همین امر می‌تواند نشان‌دهنده کارایی نسبی جدایه YD5 در مقایسه با جدایه BR4 باشد. شکل‌های ۱ و ۲ نیز خطوط احتمال و نقاط مربوط به نمونه‌ها را به ترتیب نشان می‌دهند.

جدول ۱- نتیجه نهایی آزمایش زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه‌های بومی و Dipel (شاهد)

Table 1. The final result of the bioassay of neonates and two native isolates and Dipel as control

جدایه Dipel (شاهد)		BR4		YD5		تعداد لارو مورد آزمایش Examined larvae number
تعداد لارو باکتریایی تلف شده Bacterial killed larvae (No.)	اسپور در هر غلظت Spore in each concentration	تعداد لارو باکتریایی تلف شده Bacterial killed larvae (No.)	اسپور در هر غلظت Spore in each concentration	تعداد لارو باکتریایی تلف شده Bacterial killed larvae (No.)	اسپور در هر غلظت Spore in each concentration	
34	1.7×10^1	2	4.05×10^1	1	5.8×10^1	75
44	1.7×10^3	3	4.05×10^3	5	5.8×10^3	75
56	1.7×10^5	6	4.05×10^5	15	5.8×10^5	75
61	1.7×10^7	10	4.05×10^7	34	5.8×10^7	75
67	1.7×10^9	19	4.05×10^9	63	5.8×10^9	75

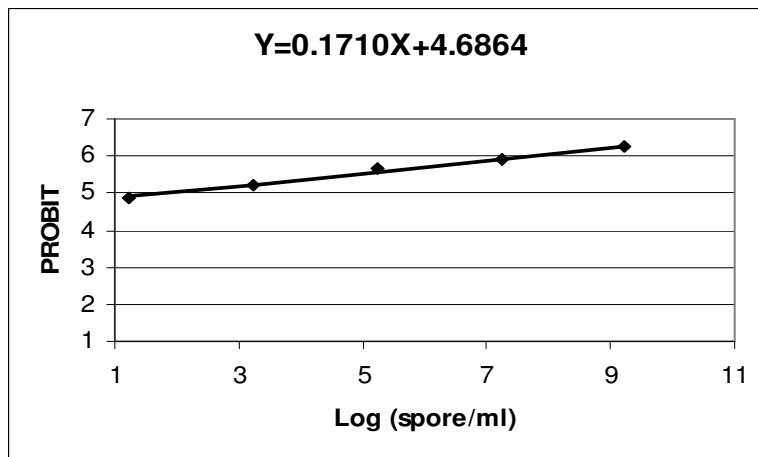
جدول ۲- نتیجه محاسبات نرم‌افزار پروبیت

Table 2. The results of Probit software assessments

جدایه Isolate	YD5	BR4	Dipel
معادله خط پروبیت Equation of the Probit Line	$Y = 0.4027 X + 1.9060$	$Y = 0.1652 X + 2.7053$	$Y = 0.1710 X + 4.6864$
تعداد تکرار محاسبات Replications	5	4	3
ارزش X^2 X^2 Value	2.7592	0.3955	0.3457
برآورد Log (LC50)	7.6823	13.8906	1.8343
برآورد LC50	48121075.9020	77727472691000.00	68.2864
خطای استاندارد Log(LC50) Standard Error	0.2216	1.5875	0.6041

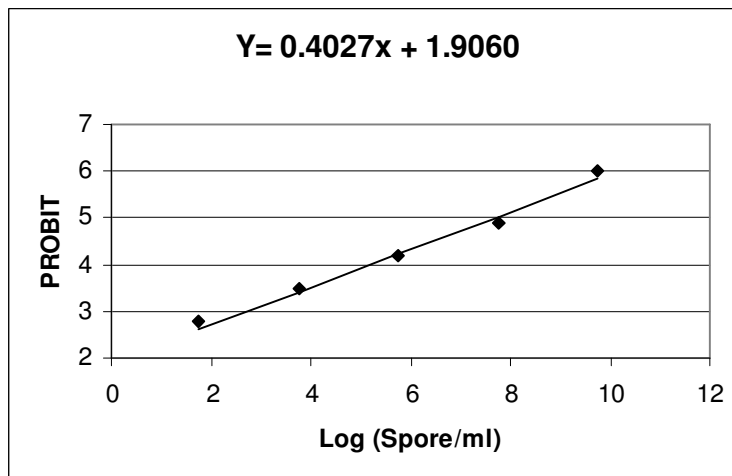
در این مطالعه غلظتی از باکتری که ۵۰٪ جمعیت لاروهای نئونات کرم قوزه پنبه را تلف می‌کرد (LC50) در مورد جدایه‌های باکتری Bt، ۷ روز پس از آغاز زیست‌سنجی‌ها ارزیابی شد. LC50 برای جدایه Dipel، $11/7790$ اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده $1/5618$ تا $2/4517$ با اطمینان ۹۵٪)، برای جدایه YD5، 18×10^{15} اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده 31×10^{11} تا 21×10^7) و برای جدایه BR4، 77×10^{12} اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده

$10^{10} \times 48$ تا $10^{18} \times 11$ با اطمینان ۹۵٪ نشان دهنده میزان کارایی این ایزوله‌ها می‌باشد. به طوری که جدایه YD5 در مقایسه با جدایه ایرانی از راندمان بهتری در ارتباط با LC50 برخوردار بوده و علی‌رغم آن که همچنان با فرمولاسیون تجاری Dipel فاصله معنی‌داری دارد، اثر قوی‌تری در تلفات لاروها در مقایسه با BR4 داشته است. در تعیین و مقایسه میزان کارایی باکتری‌ها در آزمون‌های زیست‌سنجی، استاندارد کردن روش، غلظت‌های استفاده شده، نوع غذا، وزن لاروها و استرین ژنتیکی اهمیت بسزائی دارد.



شکل ۱- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه استاندارد Dipel

Fig. 1. Bioassay the neonates and control isolate, Dipel



شکل ۲- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه ایرانی YD5

Fig. 2. Bioassay the neonates and the native isolate, YD5

بحث

یکی از 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 کنترل‌کننده میکروبی در غلظت معلوم و 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. مثلاً در مورد Bt به علت زیاد بودن تعداد 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 تحت آزمایش است. یک اصل مهم این است که برای سنجش خاصیت سمی و نیز بیماری‌زایی پاتوژن‌های حشرات بایستی آزمون روی موجود مناسب و حساس انجام گیرد. جدایه‌های مختلف Bt اثرات متفاوتی روی میزبان‌های مورد آزمایش به جا می‌گذارند، این اثرات حاصل تفاوت محیط‌های اکولوژیکی مختلف می‌باشند. لذا زیست‌سنجی 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 مطالعات انجام گرفته 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 ترکیب 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 برای کنترل جمعیت آفت هدف تأثیر خواهد گذاشت. 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 شناسایی شدند. همچنین مقدار LC50 برای این دو سویه به ترتیب $10^6 \times 6/7$ سلول در میلی‌لیتر محلول و $10^6 \times 8/6$ سلول در میلی‌لیتر محاسبه گردید (Polanczyk et al., 2000). نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از سایر تحقیقات نشان‌دهنده مقاومت نسبی لاروهای کرم قوزه پنبه به دو سویه یزد و بوشهری مورد استفاده در این بررسی است. در صورت نیاز به کاربرد این جدایه‌های بومی می‌بایست از غلظت‌های بسیار بالای آن‌ها استفاده شود. همچنین در تحقیقات دیگری در ارتباط با تأثیر سن میزبان بر قدرت کشندگی Bt، مشخص گردید که بیش‌ترین میزان مرگ و میر در سنین بالای لاروی اتفاق می‌افتد؛ و تاکنون اطلاعات چندانی در مورد مرگ و میر شفیره‌ها یا افراد بالغ گونه‌های مختلف میزبان در اثر مصرف این باکتری وجود ندارد (Ghasemi Kahrizheh and Aramideh, 2015)؛ لذا با این اصل می‌توان پیشنهاد نمود که در مطالعات مشابه میزان مرگ و میر لاروهای کرم قوزه پنبه و شفیره‌ها و افراد بالغ در اثر جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق بررسی شود.

References

منابع

- افشار، ج. ۱۳۱۷. آفات صیفی، سبزیجات، نباتات صنعتی و علوفه ایران و دفع آن‌ها. نشریه اداره کل کشاورزی. ۱۲۴ صفحه.
- ایزدی‌یار، س. ۱۳۸۱. زیست‌سنجی جدایه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتاگروتوکسین در آن‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۱۷ صفحه.
- ایزدی‌یار، س.، امیرصادقی، س.، بیات اسدی، ه.، سعیدی، ک. و عبائی، م. ۱۳۷۴. جداسازی *B. thuringiensis* از لاروهای بیمار ابریشم‌باف ناجور. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۲۵۶.
- جوانمقدم، ه. و حیدری، ح. ۱۳۷۴. مقایسه تأثیر دو حشره‌کش *Bacillus thuringiensis* روی پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۷۲.

- حیدری، ح. ۱۳۷۴. مقایسه دو حشره کش دیفلوبنزورون روی لارو سن ۵ ابریشم باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم کشاورزی ایران ۲۶ (۳): ۷۳-۷۸.
- رضایانه، م. ۱۳۸۰. بررسی تفاوت‌های بیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های ایرانی ویروس گرانولوزیس سیب (*Cydia pomonella granulovirus*). رساله دکتری. حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۲ صفحه.
- صفر عزیزاده، م. ح. ۱۳۵۵. بررسی اثر بیماری‌زایی *Bacillus thuringiensis* روی لارو برگ‌خوار بلوط. نشریه آفات و بیماری‌های گیاهی ۴۳: ۶۳-۵۸.
- کریمی، ج.، شاه‌ی، ح.، عباسی‌پور، ح.، نصیری مقدم، 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.
- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature* 173: 454-546.
- Bajwa, W.I. and Kogan, M. 2001. Integrated plant protection center (IPPC) Oregon State University, Corvallis.
- Bird, L.J. and R.J. Akhurst. 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.
- de Barjac, H. And Bonnefoi, A. 1972. Presence of H-antigenic subfactors in serotype 5 of *Bacillus thuringiensis* var. *Canadensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 20: 212-213.
- de Barjac, H., Larget, I. And Killick Kendrick, R. 1981. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Serotype H14, to the larvae of phlebotomine vectors of leishmaniasis. *Bulletin of the Exotic Society of Pathology* 74: 485-489.
- Dulmage, H.T. and Martinez, E. 1973. The effects of two continuous exposure 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.
- Ferro, D.N. and W.D. Gelenter. 1989. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to Colorado potato beetle. *Journal of Economic Entomology* 82: 750-755
- Ferro, D.N. and Slocombe, A.C. and Mercier, C.T. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): residual mortality and artificial weathering of formulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*. *Journal of Economic Entomology* 90: 574-582.
- Ghassemi-Kahrizeh, A. and Aramideh, S. 2015. Sub-lethal effects of *Bacillus Thuringiensis* on larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (coleopteran: Chrysomelidae). *Archive of Phytopathology and Plant Protection* 48(3): 259-267.
- Goldberg, L.J., Margalit, J., Undeen, A.H. and Nagel, W.L. 1977. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. *Mosquito News* 38: 524-527.
- Heimple, A.M. 1967. Safety of insects-pathogens for man and vertebrates. In Burges, H.D and N.W. Hussey. Eds. *Microbial control of insects and mites*. Academic press, New York. pp: 469-489.
- Hosseinzadeh, A. and Aramideh, S. 2016. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Spinosad* on three larval stages of beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(5): 375-379.
- Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (Sotto disease). *Dianihen Sanshi kaiho*. The safety of microbial insecticides 114(1): 36-39.
- Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. and Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of coleopteran. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* 96: 500-508.
- Kurstak, E. and P. Tijssen. 1982. Microbial and Viral insecticides. Pp: 3-45. In: Dekker, M. and Kurstak, E. (eds) *Microbial and Viral pesticides*. New York.
- Lianshen, Z. 1994. Bioassay Bt insecticide. Pp. 41-55. In: International training course on Bt production and APPL. Bt Research and Development center, Hubai Academy of Agricultural Science, China.

- Lonc, E., Doroszkiewicz, W., Klowden, M.J., Rydzanicz, K. and Galgan, A. 2001.** Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. *Journal of Vector Ecology* 26(1): 15-20.
- Polaczyk, R.A., de Silva, R.F.P. and Finza, L.M. 2000.** Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda*. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 165-167.
- Russel T.L., Brown M.D., Purdie D.M., Ryan P.A. and Kay, B.H. 2003.** Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) formulations for mosquito control in Australia. *Journal of Economic Entomology* 96: 1786-1791
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. 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.