بررسی تفاوت بیولوژیک دو جدایه ایرانی *Bacillus thuringiensis* (KH4 and GN9) بر روی سوسک برگخوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)

The study of biological differences between two native isolates of *Bacillus thuringinesis* (KH4 and GN9) on potato leaf beetle *Leptinotarsadecemlineata*Say (Coleoptera: Chrysomelidae)

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۱

چکیده

سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) به عنوان آفت جدی محصول سیب‌زمینی کشور دارای میزبان‌های متعددی است که برای مبارزه با آن راهکارهای گوناگونی به‌کار می‌روند که یکی از این راهکارها مبارزه بیولوژیک با استفاده از باکتری *Bacillus thuringiensis* می‌باشد. در این تحقیق زیست‌سنجی دو جدایه بومی باکتری Bt برروی لاروهای سوسک کلرادو انجام گرفت و از جدایه تجاری استاندارد (Costum BC) به منظور تخمین LC50 و به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین درصد تلفات لاروهای سن دوم سوسک کلرادو در اثر جدایه‌های بومی Bt نشان داد که بین تیمارهای مورد آزمایش و جدایه استاندارد در تمامی غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد؛ جدایه استاندارد با ۶۲٪ تلفات بالاترین کارایی را داشت و جدایه‌های بومی با تلفاتی کم‌تر از ۵٪ مشاهده شدند. اگرچه جدایه‌های بومی در غلظت‌های بالاتر تلفات امیدبخشی را نشان دادند ولی در مقایسه با تیمار شاهد کارایی قابل قبولی نداشتند. می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب غلظت مناسب (حدود LC50) و مقایسه میانگین درصد تلفات در این غلظت جهت غربال‌گری جدایه‌ها روش مناسبی باشد.

واژگان کلیدی: سوسک برگخوار سیب‌زمینی، *Bacillus thuringiensis*، KH4 و GN9

۱- دانش‌آموخته حشره‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۵- استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین -پیشوا، ورامین، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: n.kheradpir@gmail.com

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 از رده باکتری‌های مستقل از نور، خانواده Bacillaceae می‌باشد (Sneath, 1986). این باکتری گرم مثبت و اسپورزا است و به گونه‌های دیگر *Bacillus* نظیر *B. cereus* بسیار شبیه بوده و اغلب در طول مرحله اسپورزایی کریستال‌های پروتئینی تولید می‌کند (تاج‌بخش، ۱۳۶۸). این باکتری دارای زیرگونه‌ها و جدایه‌های متعددی است؛ برای مثال در ایران مرزبان (۱۳۷۶) یک ایزوله بومی Bt را از خاک مزارع کرمانشاه جداسازی نمود. همچنین یک استرین بومی Bt از لاروهای بیمار ابریشم بافناجور از استان کهکیلویه و بویراحمد متعلق به زیرگونه *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*، جداسازی شده است (ایزدیار و همکاران، ۱۳۷۴). در بررسی‌های بعدی ایزدیار و همکاران (۱۳۸۲)، سیزده ایزوله بومی Bt را از خاک‌های زراعی و مناطق جنگلی شمال کشور جداسازی نمودند. در تحقیقات مشابه در خارج از کشور نیز جدایه‌هایی از این باکتری از محصولات انباری توسط Meadows (1993) جداسازی شدند. (Bernhard *et al.*, 1997) از بسترهای زیستی گوناگون شامل خاک، مواد انباری، بقایای سوختگی، مواد گیاهی و سایر بسترها در ۸۰ کشور در کل ۵۳۰۳ ایزوله Bt دارای کریستال جدا نمودند که ۴۵/۵ درصد ایزوله‌ها از مواد انباری، ۲۵/۳ درصد از خاک، ۱۰/۶ درصد از بقایای بدن حشرات، ۳/۴ درصد از مواد گیاهی و مابقی ۱۵/۳ درصد از موادی غیر از مواد مذکور جدا شدند.

سوسک برگخوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) یا سوسک کلرادو آفتی بومی آمریکای شمالی است (Say, 1823). این آفت پس از سال ۱۸۷۷ همراه با واردات سیب‌زمینی و سایر محصولات از آمریکا به اروپا وارد شده است. سوسک برگخوار سیب‌زمینی در ایران تا سال ۱۳۶۳ شمسی جزو آفات قرنطینه‌ای کشور محسوب می‌شد و اولین بار در بهار سال ۱۳۶۳ خسارت آن در مزارع سیب‌زمینی بیش از ۳۷ قریه در استان اردبیل مشاهده گردید (کاظمی، ۱۳۶۳). اردبیلی (۱۳۷۱) در تحقیقات متعدد بر روی میزان کارآیی روش‌های مختلف مدیریتی بر روی سوسک کلرادو سیب‌زمینی، اثر چند ماده حشره‌کش را بر روی این آفت در مزارع سیب‌زمینی اردبیل بررسی کرد. همچنین در تحقیق دیگری اثر روش‌های مبارزه شیمیایی و غیرشیمیایی در کاهش جمعیت سوسک کلرادو مورد بررسی قرار گرفت (اردبیلی و همکاران، ۱۳۷۶). قاسمی کهریزه و همکاران (۱۳۸۱) تأثیر باکتری Bt بر روی مرگ و میر سنین مختلف لاروی سوسک کلرادو را مورد مطالعه قرار دادند. مقایسه میزان تأثیر برخی حشره‌کش‌های شیمیایی با بیولوژیکی در کنترل سوسک کلرادو در مزارع سیب‌زمینی میاندوآب توسط (رنجی و همکاران، ۱۳۸۴) انجام شد. نظریان (۱۳۸۶) غربالگری مولکولی ایزوله‌های بومی Bt مؤثر بر راسته سخت بالپوشان را بر اساس ژن‌های *cry* و *vip* انجام داد.

هدف از این تحقیق برداشتن گامی در راستای مدیریت تلفیقی آفات و تسهیل در استفاده از عوامل بیمارگر حشرات در کنترل بیولوژیک آفات می‌باشد. از آن‌جایی‌که Bt یک میکروارگانیسم عمومی خاکزی است، لذا با مطالعات وسیع در جهت شناسایی جدایه‌های مختلف این باکتری در مناطق اکولوژیکی کشور می‌توان به جدایه‌های جدیدی که با شرایط اقلیمی هر منطقه سازگاری بیش‌تری دارند، دست یافت که برای آفات کلیدی و مهم نظیر سوسک برگخوار سیب‌زمینی موثر و مفید باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشره میزبان

لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی از مزارع آلوده سیب‌زمینی اردبیل و همدان جمع‌آوری شده و درون قوطی‌های درب‌دار پلاستیکی حاوی برگ سیب‌زمینی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. کلیه مراحل رشدی حشره در اتاق پرورش با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز نگهداری شدند. سوسک‌های بالغ بر روی گلدان سیب‌زمینی درون قفس نگهداری شدند. نوارهای حاوی تخم در ظروف بستنی

با درب بدون منفذ همراه با پنبه مرطوب قرار گرفتند. شفیره‌ها در ظروف پلکسی‌گلس حاوی خاک اره استریل تا زمان خروج افراد بالغ نگهداری شدند.

کشت و نگهداری عامل بیماری‌زا

انتخاب جدایه‌ها بر اساس وجود ژن‌های مؤثر بر راسته سخت بالپوشان در تحقیقات قبلی (نظریان، ۱۳۸۶) بوده است. به این ترتیب دو جدایه GN9 (جدا شده از خاک گلستان) با شکل کریستال نامنظم و KH4 (جدا شده از خاک مزرعه چغندر در کرمانشاه) با کریستال دو هرمی کروی و مستطیلی شکل و دارای ژن‌های 8A، 18، 28، 8B، 7A، 34 و 35 و فرآورده تجاری Custom B.C (*B. thuringiensis* var *tenebrionis*) به‌عنوان جدایه استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند. مرجع استاندارد زیست‌سنجی در مورد راسته سخت بالپوشان برای فرآورده‌های باکتریایی در اکثر کشورهای جهان *B. thuringiensis* var *tenebrionis* می‌باشد که در این آزمایشات نیز از همین ترکیب به عنوان شاهد استفاده گردید.

برای تهیه غلظت‌های مختلف باکتری، کشت اولیه از نمونه‌های بومی باکتری لئوفیلیز شده در فریزر با دمای ۶۰- درجه سلسیوس صورت گرفت. بدین ترتیب بعد از کشت ۲۴ ساعته روی محیط (Nutrient Agar) .N.A در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی از روی محیط به وسیله لوپ استریل جمع‌آوری و به ارلن‌های محیط کشت L. Bloth منتقل شدند (Sambrook *et al*., 1989). بعد از ۵ روز، محیط کشت حاوی اسپور-کریستال آزاد در لوله‌های استریل ریخته شده و بعد از قید نام ایزوله روی آن، در سانتریفوژ (دور ۳۰۰۰ با دمای ۳ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. مخلوط باکتری به ترتیب با ۲ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سانتریفوژ شد. نهایتاً اسپور-کریستال در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری همراه با ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و در فریزر با دمای ۱۳- درجه سلسیوس نگهداری شد (Bird and Akhurst, 2007).

مطالعه جدایه‌های بومی Bt روی محیط کشت

دو جدایه 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. 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.

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

اندازه‌گیری غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه Spectrophotometer

به منظور تهیه غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر) باکتری، ۲۰ میلی‌گرم از محلول استوک BSA (Bovin Serum Albumin) با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید 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 با سه بار تکرار انجام گرفت. به منظور شمارش تعداد اسپورهای زنده با قابلیت رشد و تندش از روش (Colony Forming Unit) CFU 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 شد. غلظتی که در آن تعداد کلنی‌ها قابل شمارش باشد، به عنوان رقت مبنا برای شمارش کلنی هر ایزوله در نظر گرفته شد. برای این غلظت مبنا، ۳ تکرار در نظر گرفته شد و تعداد کلنی بعد از ۲۴ ساعت شمارش و با ضرب میانگین این ۳ شمارش در عکس رقت، تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر محلول استوک بدست آمد.

زیست‌سنجی جدایه استاندارد روی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *(L. decemlineata)*

برای زیست‌سنجی و تعیین LC50، از غلظت‌های آماده شده استفاده گردید. ۵ غلظت از جدایه (Custom BC) کشت داده شد و برای هر غلظت ۲۰ ظرف پلاستیکی با قطر دهانه ۶ سانتی‌متر در نظر گرفته و ۳ تکرار زمانی نیز انجام گرفت. بدین ترتیب برای ۵ غلظت و شاهد ۳۱۵ ظرف مهیا و شماره‌گذاری گردید.

در این زیست‌سنجی از روش غوطه‌وری برگ در سوسپانسیون اسپور-کریستال استفاده شد (Ferro and Gelenter, 1989). بدین ترتیب از برگ‌های تازه سیب‌زمینی دیسک‌هایی به قطر ۳ سانتی‌متر بریده و در غلظت‌های از پیش ساخته شده غوطه‌ور شد؛ به طوری‌که تمام سطح برگ آغشته به محلول گردد. سپس به منظور خشک شدن برگ‌ها، سی دقیقه در محیط استریل قرار گرفتند. سپس درون هر ظرف یک دیسک برگی همراه با یک لارو سن دو قرار گرفت. ظروف زیست‌سنجی در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز قرار گرفتند. میزان مرگ و میر لاروها بعد از ۴ روز بررسی شد. آزمایش زیست‌سنجی ۳ بار تکرار گردید و اطلاعات به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

مقایسه جدایه‌های بومی با جدایه استاندارد در حدود غلظت LC50

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

در جدایه استاندارد غلظتی که ۵۰ درصد جمعیت لاروها را از بین ببرد در تمامی جدایه‌ها با ۳ تکرار زمانی تست شده و آماربرداری از تلفات بعد از ۴ روز انجام گردید. میانگین درصد تلفات لاروهای سن ۲ سوسک کلرادو سیب‌زمینی با استفاده از برنامه آماری MSTATC مورد ارزیابی قرار گرفت.

انتخاب غلظت LC50 و مقایسه میانگین درصد تلفات جهت غربال‌گری جدایه‌ها از نظر وقت و هزینه روشی کاراتر می‌باشد. طبق آزمایشات مقدماتی مشاهده گردید که غلظت‌های رقیق‌تر از LC50 کشندگی مطلوبی نداشته و غلظت‌های بالاتر نیز معیار مناسبی برای سنجش کارایی جدایه‌ها نیستند لذا غلظتی از جدایه استاندارد که ۵۰ درصد جمعیت لاروها را از بین برده بود به عنوان مبنای مقایسه قرار گرفت.

نتایج

بررسی مقایسه‌ای واحدهای غلظت باکتری

مقدار پروتئین سنجیده شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، نمی‌تواند برآورد دقیقی از تعداد کریستال موجود در جدایه‌ها باشد، زیرا در این روش کلیه اجزای سلول باکتری که ماهیت پروتئینی دارند سنجیده می‌شوند. شمارش تعداد کلنی تشکیل شده روی محیط کشت N.A. می‌تواند نمایان‌گر تعداد اسپور زنده قابل تندش باشد و نسبت به روش‌های ذکر شده دارای دقت بیش‌تری است (جدول ۱).

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

Table 1. Spore abundance, cell numbers and protein concentration of Bt isolates

شمارش اسپور در میلی‌لیتر Spore abundance in (Spore/ml)ml	تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر Bacterial cell abundance in ml (CFU/ml)	غلظت پروتین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Protein concentration by Spectrophotometer (µg/ml)	جدایه باکتری Bacterium isolate
3.7×10^{9}	4×10^{11}	4.61	CBC
1.7×10^{9}	8.5×10^{11}	4.94	KH4
4.1×10^{9}	1.06×10^{12}	1.21	GN9

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

نتایج حاصل از زیست‌سنجی استاندارد

با استفاده از برنامه پروبیت، LC50 جدایه استاندارد به‌دست آمد. بدین ترتیب غلظتی که در آن ۵۰ درصد جمعیت لاروها از بین رفتند برابر با CFU/ml ۲۵۰۶/۶۳ محاسبه گردید. 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 نقاط با خطوط است (Robertson and Preisler, 1992 به نقل از رضاپناه، ۱۳۸۰). لذا تمامی خطوط پروبیت در سطح احتمال ۱٪ با نقاط مشاهده شده برازش دارند. بر اساس جدول ۲، مقدار LC50 در کم‌ترین غلظت از تیمار استاندارد برابر با ۴×۱۰^{۳} CFU/ml است.

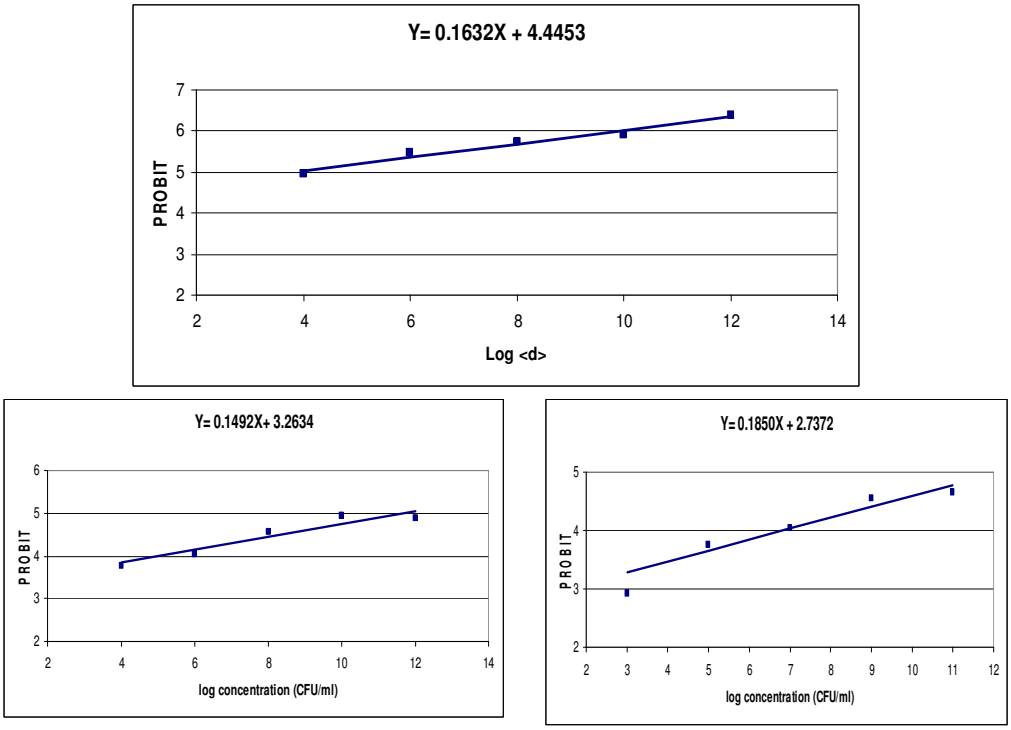
محاسبات نرم‌افزار پروبیت

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

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

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

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



شکل ۱- زیست‌سنجی با لاروهای نئونات و جدایه استاندارد (بالا)، جدایه GN9 (راست) و جدایه KH4 (چپ): محور عمودی

Fig. 1. Probit figure for bioassay of neonates and standard isolate (up), GN9 (right) and KH4 (left)

مقایسه کارایی جدایه‌های بومی با جدایه استاندارد در غلظت‌های مختلف

آماربرداری از تلفات تیمارها در روز چهارم آزمایش انجام گردید. تجزیه آماری به صورت طرح کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه آماری MSTATC انجام گرفت و نشان داد که در سطح احتمال ۱ ٪ تفاوت معنی‌داری بین تیمار استاندارد و جدایه‌های بومی در تمامی غلظت‌ها وجود دارد. مقایسه میانگین درصد تلفات ناشی از تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که جدایه استاندارد در تمامی غلظت‌ها با بیش از ۶۲٪ تلفات، بالاترین کارایی را نسبت به جدایه‌های بومی دارد؛ در مقابل اما جدایه‌های بومی با تلفاتی بسیار کم در مقایسه با جدایه استاندارد ضعیف شناخته شدند (جدول ۳). در این مقایسات این نکته مشخص گردید که با افزایش غلظت، میزان کارایی جدایه‌های بومی نیز فزونی یافت. اگرچه جدایه‌های بومی در غلظت LC50 کارایی مطلوبی در حد استاندارد از خود نشان ندادند اما می‌توان با افزایش غلظت تلفات امیدبخشی را مشاهده کرد. در عین حال بر اساس نتایج به‌دست آمده، درصد تلفات ناشی از جدایه KH4 در مقایسه با GN9 بهتر بود. با این وجود همین جدایه KH4 تنها در بالاترین غلظت خود توانست بیش از نیمی از جمعیت لاروهای هدف را از بین ببرد که از این لحاظ جدایه ضعیفی محسوب شده و به نوعی سوسک برگخوار سیب‌زمینی نسبت به این باکتری مقاوم است.

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

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

جدایه‌های مورد آزمایش	غلظت‌های مورد استفاده از هر جدایه Different concentration of each isolate				
Studied isolates	10^4 CFU/ml	10^6 CFU/ml	10^8 CFU/ml	10^{10} CFU/ml	10^{12} CFU/ml
Standard	62a±0.06	65a±0.05	73a±0.02	80a±0.02	92a±0.04
KH4	4b±0.01	10b	28b	43ab	67ab±0.02
GN9	0 b±0.01	10b±0.02	17b±0.02	14b±0.04	42b±0.04

بحث

یکی از کاراترین روش‌هایی که برای غربال کردن میکروارگانیسم‌ها و تعیین بیماری‌زایی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیست‌سنجی است. در حقیقت زیست‌سنجی روشی است که برای تعیین اثرات بیولوژیکی عوامل کنترل کننده میکروبی در غلظت معلوم تحت شرایط کنترل شده به‌کار می‌رود. 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 قرار می‌گیرد. 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. جدایه‌های مختلف Bt اثرات متفاوتی روی میزبان‌های مورد آزمایش به‌جا می‌گذارند، این اثرات حاصل تفاوت محیط‌های اکولوژیکی مختلف می‌باشد. در یکی از قدیمی‌ترین بررسی‌های انجام شده حساسیت سوسک برگخوار سیب‌زمینی نسبت به باکتری Bt بررسی گردید و ماده ß-endotoxin در ساختار باکتری عامل بیماری‌زایی در سوسک کلرادو شناسایی شد (Ignoffo *et al.*, 1982). در همین تحقیق مشخص گردید که لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی در برابر ۳۳/۵۵۰ IU/mg از باکتری *B. thuringiensis kurstaki* حساسیت نشان داده و مرگ و میر قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان دادند. در تعیین و مقایسه میزان کارائی باکتری‌ها در آزمون‌های زیست‌سنجی، استاندارد کردن روش، غلظت‌های استفاده شده، نوع غذا، وزن لاروها و استرین ژنتیکی اهمیت بسزایی دارد، 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. برای مثال (Naimov *et al.*, 2006) بیان نمود که وجود کریستال‌های دو هرمی در ساختار جدایه مانع از فعالیت باکتری بر علیه سخت بالپوشان به خصوص سوسک برگخوار سیب‌زمینی می‌شود. طبق بررسی‌های (Deist *et al.*, 2014) نیز شکل و ساختار کریستال موجود در جدایه‌های باکتری Bt تأثیر مستقیمی بر کارایی آن‌ها و خاصیت کشندگی به خصوص بر روی گروه‌های خاص حشرات دارد؛ همین نکته می‌تواند دلیل اصلی مقاومت سوسک برگخوار به جدایه KH4 باشد. در بررسی دیگری توسط Ghasemi-Kahrizeh and (Aramideh, 2015) مشخص گردید که بیش‌ترین مرگ و میر لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی در سنین بالای لاروی و حتی دوره شفیرگی به علت تغذیه تدریجی لاروها از برگ‌های آلوده به دو ایزوله *Bt.* var *tenebrionis* و *Bt.* var *kurstaki* رخ می‌دهد و از این رو می‌بایست در تحقیقات مرگ و میر تمامی سنین لاروی نسبت به این باکتری‌ها بررسی شود و صرفاً بررسی سن دوم لاروی نمی‌تواند داده‌های قانع‌کننده‌ای ارائه نماید. در مطالعات مشابهی میزان مرگ و میر لاروهای سن دوم سوسک برگخوار سیب‌زمینی بر اثر چندین جدایه باکتری Bt مورد بررسی قرار گرفت و مقدار سطح کشندگی آن‌ها بین ۱۹۷-۲/۲۲۶ ppm محاسبه گردید (Patel *et al.*, 2015) که نتایج به دست آمده در این تحقیق در مقایسه با ایزوله‌های بومی ایرانی دارای اختلاف محسوس است. در نهایت می‌توان این‌طور نتیجه گیری نمود که جدایه‌های مورد استفاده در این مقاله از کارایی مطلوبی در جهت مرگ میر لاروهای سوسک کلرادو برخوردار نبوده و نوع ساختار کریستال آن‌ها عامل اصلی محدودکننده‌ای است که باید در تدوین برنامه‌های مدیریت تلفیقی سوسک برگخوار سیب‌زمینی مد نظر قرار گیرد.

منابع References

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

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

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

ایزدیار، س.، طالبی جهرمی، خ.، عسگری، ح. و رضاپناه، م. ر. ۱۳۸۲. تشخیص و اندازه‌گیری بتاگزوتوکسین در جدایه‌های ایرانی *B. thuringiensis*. نامه انجمن حشره‌شناسی ایران، ۲۳: (۱)، ۶۷-۵۵.

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

رضاپناه، م. ۱۳۸۰. بررسی تفاوت‌های بیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های ایرانی ویروس گرانولوزیس سیب (*Cydia pomonella* granulovirus). رساله دکتری. حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۲ صفحه.

رنجی، ح.، مرزبان، ر. و همایونی‌فر، م. ۱۳۸۴. مقایسه تاثیر برخی حشره‌کش‌های شیمیایی و بیولوژیک در کنترل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی در مزارع سیب‌زمینی میاندوآب. دانش کشاورزی، مجله علمی- پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز. ۳ (۱۵): ۱۴۹-۱۴۳.

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

کاظمی، م. ح.۱۳۶۳.سوسک سیب‌زمینی یا سوسک کلاور، گزارش و بیماری‌های گیاهی، تبریز.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Naimov, S., Martens-Uzunova, E., Weemen-Hendriks, M., Dukiandijev, S., Minkov, I., de Maagd, R. A. 2006. Carboxy-termina extension effects on crystal formation and insecticidal properties of Colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Molecular Biotechnology 32: 185-196.

Patel, A., Pathak, L., Parvez, N., Panpatte, D., Khatri, K. and Jani, J. 2015. Molecular approaches for the improvement of *Bacillus thuringiensis* against pests. Pp: 179- 185. In: Chakravathy, A. K. (ed.). Insect Molecular Biology. New Horizon in Insect Science: Towards Pest Management.

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

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

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