بررسی فراوانی ژن های توکسین Cyt_1 و Cyt_2 در جدایه های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* جدا شده از خاک مناطقی از استان های اصفهان، تهران، مازندران و خراسان

روح اله عباسیان جزی[1*]، حبیب عباسی پور[1]، منصوره کشاورزی[2]
۱) دانشگاه شاهد ۲) موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر Ro.abbasiyan@gmail.com

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* یک باکتری شناخته شده برای کنترل بیولوژیک آفات می باشد. این باکتری گرم مثبت، تولید کننده اسپور و خاکزی می باشد. ویژگی مهم آن تولید اجسام کریستالی در فاز رکود می باشد که برای راسته های مختلف حشرات کشندگی اختصاصی دارد. این جسم کریستالی محتوی دو گروه توکسینی *Cry* و *Cyt* می باشد. توکسین *Cry* دارای انواع مختلف بوده که انواع مختلف آن برای راسته مختلف حشرات مانند بالپولکداران، قاب بالان، دوبالان و غیره اثر سمی دارد و برای راسته های دیگر حشرات و جانداران دیگر بی اثر می باشد. اما توکسین *Cyt* تنها در جدایه های موثر بر روی حشرات راسته دوبالان دیده می شود و اثر هم افزایی با توکسین های موثر *Cry* دارد. در این پژوهش فراوانی دو ژن Cyt_1 و Cyt_2 در ۲۵ جدایه بومی با استفاده از واکنش PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که فراوانی این دو ژن به ترتیب ۸ و ۲۰ درصدی می باشد.

کلمات کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، توکسین Cyt_1، Cyt_2، راسته دوبالان

مقدمه

کنترل بیولوژیک آفات دارای اهمیت زیادی می باشد، چراکه آفات می توانند بخش زیادی از محصولات کشاورزی را از بین ببرند. برای مبارزه با آفات دو روش شیمیایی و بیولوژیک مرسوم می باشد. مبارزه شیمیایی روشی قاطع می باشد ولی باعث آلوده سازی محیط زیست می شود و البته مقاومت هایی نیز نسبت به آن به وجود آمده است. مبارزه بیولوژیک شامل استفاده از مواد کشنده طبیعی حشرات می باشد که شامل شکارگرها، قارچ ها، باکتری ها ویروس ها و غیره می شود. از مهمترین باکتری ها در این رابطه باکتری *Bacillus thuringiensis* می باشد که بیش از ۹۰ درصد از محصولات حشره کش بیولوژیک را به خود اختصاص داده است (۱). این باکتری یک باکتری هوازی اختیاری، گرم مثبت و تولید کننده اسپور می باشد که در فاز رکود اجسام کریستالی از جنس پروتئین تشکیل می دهد که ۲۰ الی ۳۰ درصد کل پروتئین باکتری را تشکیل می دهد (۲). این کریستال پروتئینی محتوی دو گروه توکسینی *Cry* و *Cyt* می باشد. توکسین *Cry* به بیش از ۵۰ گروه اصلی تقسیم می شود (۳ و ٤) که انواع مختلف آن برای راسته های مختلف حشرات سمیت اختصاصی داشته و برای سایر راسته ها بی اثر است (٦). توکسین *Cyt* به دو گروه عمده Cyt_1 و Cyt_2 تقسیم بندی می شود. این توکسین از لحاظ ساختار و نحوه عملکرد با توکسین های *Cry* تفاوت دارد. این توکسین ها برای عملکرد خود پذیرنده ی غشایی ندارند و مستقیماً با فسفولیپید غشا واکنش می دهند (۵). این توکسین ها بر علیه حشرات راسته دوبالان موثر است و با توکسین های موثر بر این راسته مانند Cry_4 اثر سینرژیستی دارد. لذا جدایه هایی که دارای توکسین های *Cyt* را دارند، کارایی بیشتری در مبارزه علیه حشرات راسته دوبالان دارند (۳). هدف این پژوهش این بود تا جدایه هایی که دارای این دو ژن Cyt_1 و Cyt_2 هستند شناسایی کرده و میزان حضور این دو ژن را در ۲۵ جدایه از استان های اصفهان، تهران، مازندران و خراسان را با استفاده از واکنش PCR به دست آوریم.

مواد و روش ها

جدایه های باکتری: ۱۹ جدایه باکتری که از مناطق تهران، مازندران و اصفهان جداسازی شده بودند، همچنین ٦ جدایه از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر به طور جداگانه روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و پس از ١٦ ساعت از آن برای واکنش PCR استفاده شد.

واکنش PCR: در این واکنش برای دو ژن *Cyt1* و *Cyt2* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی واکنش PCR گذاشته شد که توالی آنها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن های توکسین *Cry* مورد اسفاده در این پژوهش (۵).

ردیف	پرایمر	ژن های تکثیر کننده	توالی	محصول (bp)
۱	*Cyt1*(f)	*Cyt1*Aa *Cyt1*Ab *Cyt1*Ba	5-CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT	٤٧٧ الی ٤٨٠
۲	*Cyt1*(r)	=	5-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT	=
۳	*Cyt2*(f)	*Cyt2*Aa *Cyt2*Ba *Cyt2*Bb *Cyt2*Ca	5-ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC	۳٥٥ الی ۳٥٦
٤	*Cyt2*(r)	=	5-TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC	=

مواد واکنش طبق جدول ۲ درحجم µL ۲۰ در میکروتیوب ها ریخته شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شده و طبق برنامه جدول۳ واکنش PCR انجام شد.

جدول ۲- مقدار مواد واکنش PCR.

ردیف	مواد	مقدار (میکرولیتر)
۱	PCR buffer(10x)	۲
۲	$MgCl_2$	۲
۳	dNTP	۱
٤	Primer Forward	۱
٥	Primer Reverse	۱
٦	Taq DNA Polymerase	۰/۲
۷	Template	مقدارکمی از کلونی
۸	DDW	۱۲/۸
۹	حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر

جدول ۳- برنامه واکنش PCR.

ردیف	نام ژن	دناتوره کردن اولیه دما - زمان	دناتوره کردن دما - زمان	جفت شدن پرایمرها دما - زمان	پلی مریزه شدن دما - زمان	پلی مریزه شدن نهایی دما - زمان
۵	Cyt_1	۵ m -۷۲ oC	٦۰s - ۹٤oC	٦۰s –۵ ۰oC	٦۰s –۷۲oC	۵ m -۷۲ oC
٦	Cyt_2	۵ m -۷۲ oC	۱۵s - ۹٤ oC	۳۰s –۵ ۰oC	۳۰s –۷۲oC	۵ m -۷۲ oC

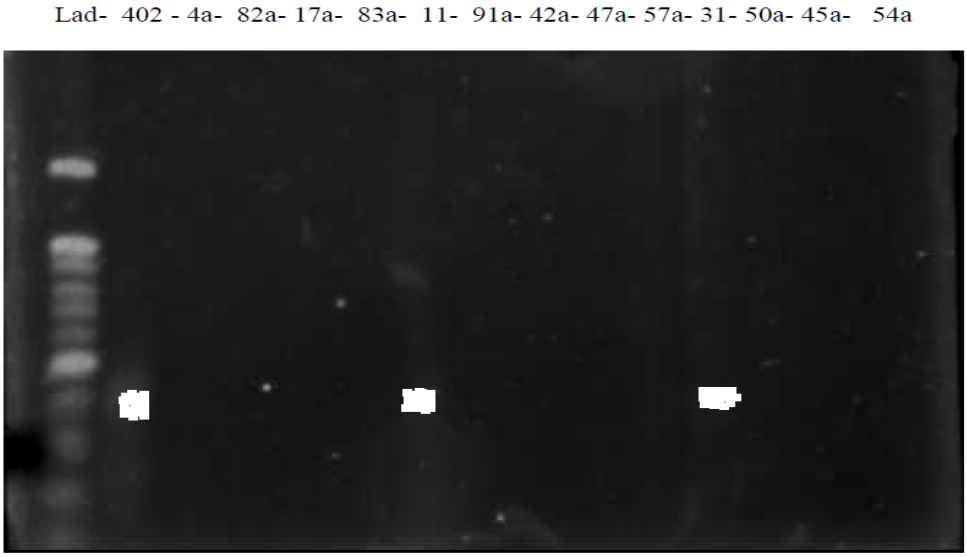
°C- درجه سلسیوس S- ثانیه m- دقیقه

مراحل اول و آخر هرکدام یکبار و مراحل دیگر برای ۳۵ بار در این واکنش برنامه ریزی شد. پس از انجام واکنش، محصول واکنش بر روی ژل آکارز یک درصد، ران شده وبا محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سپس با دستگاه ژلداک باندها مشاهده و نتایج ثبت گردید (جدول ٤).

جدول ٤- نتایج واکنش PCR

ردیف	نام جدایه	Cyt_1	Cyt_2
۱	1a	-	-
۲	4a	-	-
۳	11a	-	-
٤	17a	-	-
۵	24a	-	-
٦	42a	-	-
۷	45a	-	-
۸	47a	-	-
۹	50a	-	-
۱۰	54a	-	-
۱۱	57a	-	-
۱۲	71a	-	-
۱۳	76a	-	-
۱٤	79a	-	-
۱۵	82a	-	-
۱٦	83a	-	-
۱۷	84a	-	+
۱۸	91a	-	-
۱۹	93a	-	-
۲۰	۸	+	+
۲۱	۱۱	-	+
۲۲	۳۱	-	+
۲۳	۵۵	-	-
۲٤	۸٦	-	-
۲۵	٤۰۲	+	+

نتایج نشان داد که ژن Cyt_2 در جدایه های به دست آمده از مناطق کشور دارای فراوانی بیشتری نسبت به ژن Cyt_1 می باشد. به نحوی که فراوانی ژن Cyt_1 در این جدایه ها هشت درصد و برای ژن Cyt_2 بیست درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد که اکثریت جدایه ها فاقد این دو ژن می باشند و تنها دو جدایه ی ۸ و ٤٠٢ دارای هردو ژن می باشد.



شکل ۱- باند ۳۵۵ کیلو بازی مربوط به ژن Cyt_2 شماره هر جدایه بالای ستون مربوطه امده است.

بر طبق نتایج دو جدایه ۸ و ٤٠٢ که هردو ژن توکسین Cyt در آنها تشخیص داده شده است احتمالاً دارای کارایی بیشتری در مبارزه با آفات حشرات راسته دوبالان می باشند. البته این مهم می بایستی با واکنش های زیست سنجی نیز تایید گردد.

منابع

1. Gill, S.S., Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. 1992. "The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins", *Annual Reveiw of Entomology*, 37: 615-636.
2. Glare, T.R. and O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley, Chichester, UK, 350 pp.
3. Santos, F.P., Lopes, J., Vilas-Boas, G.T. and Zequi, J.A.C. 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**.** *Acta Tropica*, 122: 64–70.
4. Salehi Jouzani, Gh., Pourjanabad, A., SeiWnejad, 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 Indian Microbiology and Biotechnology*, 35: 83–94
5. Thomas, W.E. and Ellar, D.J. 1983. "*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Crystal □ endotoxin: Effects on Insect and Mammalian Cells *in vitro* and *in vivo*" *Journal of Cell Science*, 60: 181-197.
6. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. and Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Journal of Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.

Prevalence of *Cyt*$_2$ and *Cyt*$_1$ toxin genes in native isolates of *Bacillus thuringiensis* in the soils of some regions of Isfahan, Tehran, Khorasan and Mazandaran provinces

Roohollah Abbasiyan gazi[1*], Habib Abbasipour[1], Mansoureh Keshavarzi[2]
1. Shahed University, 2. Seed and Plant Improvement Institute of Iran

Abstract
Bacillus thuringiensis is a known bacterium for biological control of pests. This bacterium is Gram-positive, spore-producing and saprophyte. Its main feature is the production of crystalline body in stagnation phase that have specific killing for different orders of insect. This crystal body containing two groups of toxins involving *Cry* and *Cyt* toxins. *Cry* toxins have different types that different types have toxic effect for different orders of insects such as Lepidoptera, Coleoptera, Diptera and other orders of insects and for other animals are ineffective. However *Cyt* toxins only have been seen in Diptera effective isolates and with *Cry* toxins are synergetic effect with effective *Cry* toxin. In this study, the frequency of two genes, *Cyt*$_2$ and *Cyt*$_1$, in 25 indigenous isolates with using PCR reaction were investigated. The results showed that the frequency of these genes is 8 and 20 percent, respectively.
Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Cyt*$_1$, *Cyt*$_2$ toxins, Diptera order