بررسی قدرت بیمارگری و ویژگی‌های مولکولی چند جدایه‌ی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت الماسی*

مریم کلانتری[۱]، رسول مرزبان[۱]، زهرا معقولی‌فرد[۲]، حبیب عباسی‌پور[۲]

۱- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران- تهران

۲- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شاهد - تهران

مسئول مکاتبات: مریم کلانتری، m_kalantary2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۲۶ ۲۶-۱۷ (۲) ۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۱

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌خاطر مزیت‌های فراوان مانند اثر اختصاصی روی لارو حشرات آفت، عدم تأثیر نامطلوب روی محیط زیست و جاندارن غیر هدف و همچنین سهولت ترکیب و تلفیق با سایر روش‌های کنترل، جایگاه ویژه‌ای در مدیریت کنترل آفات دارد. اولین قدم به‌عنوان پایه و اساس تحقیق روی این باکتری، بررسی قدرت بیمارگری جدایه‌ها و سویه‌های بیمارگر درکنترل آفات مورد هدف است. در این تحقیق قدرت بیمارگری سه جدایه‌ی بومی و یک نمونه‌ی تجاری (Dipel®) روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* و شب‌پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xylostella* در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) بررسی شد. غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC50) سه جدایه‌ی بومی KD2، 20، 6R و نمونه‌ی تجاری دیپل روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه به‌ترتیب $۱/۲۱\times۱۰^{۷}$، $۸/۸\times۱۰^{۷}$، $۱/۳۹\times۱۰^{۷}$ و $۶/۹۱\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد که بیمارگری جدایه‌ی KD2، با کمترین غلظت کشنده ۵۰ درصد روی کرم قوزه‌ی پنبه بیشتر بود. غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد جدایه‌های بومی فوق روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی به‌ترتیب $۶/۱\times۱۰^{۴}$، $۳/۴\times۱۰^{۳}$، $۲/۹\times۱۰^{۵}$ و $۸/۸\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر بود که بیشترین قدرت بیمارگری باکتری Bt مربوط به جدایه‌ی 20 بود. در بررسی مولکولی جدایه‌ها مشخص شد که جدایه‌های مورد بررسی دارای ژن‌های *cry* یکسانی نیستند.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، کرم قوزه‌ی پنبه، شب‌پره‌ی پشت الماسی، قدرت بیمارگری، ویژگی مولکولی

مقدمه

کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae) آفت مهم پنبه، گوجه‌فرنگی، ذرت، نخود، توتون، لوبیا، سویا و کنجد است (Fit, 1989). حشره‌ی یاد شده پلی‌فاژ بوده و در دنیا بیش از ۷۰ گونه میزبان برای آن گزارش شده است. لاروهای این آفت از برگ‌های جوان، قوزه‌ها، بلال، میوه و غلاف بذور گیاهان میزبان خود تغذیه می‌کند (Mitter *et al.*, 1993).

شب‌پره‌ی پشت الماسی یا بید کلم، در کشت بوم‌های گیاهان خانواده‌ی چلیپائیان یافت می‌شود و از بیشترین پراکنش جهانی در بین بال‌پولک‌داران برخوردار است (Talekar & Shelton, 1993). در دنیا برای کنترل آن در جهان سالانه بیش از یک میلیارد دلار هزینه می‌شود (Verkerk & Wright, 1996; Dezianian *et al.*, 2010). این شب‌پره در سال ۱۳۱۷ توسط افشار به‌عنوان یکی از آفات مهم کلم از ایران گزارش شد (Behdad, 1982) و در سال ۱۳۷۸ در مزارع کلم استان تهران طغیان کرد (Marzban & Baniameri, 2004). این آفت با دارا بودن تنوع میزبانی بالا، قدرت پراکنش و تولیدمثل زیاد و

* این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم‌ها مریم کلانتری و زهرا معقولی‌فرد می‌باشد.

خصوصیات ژنتیکی، به‌خیلی از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده است (Shelton, 2004; Wright, 2004; Grzywacz *et al*., 2009) استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات گیاهی از گذشته‌های دور روشی معمول بوده است. اما هزینه‌های اقتصادی بالا، ظهور نژادهای مقاوم به‌آفت‌کش‌های شیمیایی، نگرانی‌های زیست‌محیطی و آلودگی در چرخه‌ی غذایی سبب کاهش کاربرد روش‌های شیمیایی در کنترل آفات گیاهی شده است. دلایل فوق دستیابی به‌روش‌های سالم و ارزان‌تر را به‌عنوان یک چالش جدی فرآروی محققان قرار داده است. استفاده از حشره‌کش‌های میکروبی در یکی دو دهه‌ی اخیر مورد توجه جدی قرار گرفته‌است. عوامل میکروبی بسیار متنوع هستند، ده‌ها باکتری می‌توانند درحشرات ایجاد بیماری نمایند. ولی فقط تعداد اندکی از نظر تجاری دارای اهمیّت هستند که مهمترین آن‌ها *Bacillus thuringiensis* Ber. است. واریته یا زیرگونه‌ی *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* روی شب‌پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه بسیار مؤثر است. این باکتری به‌خاطر اثر اختصاصی روی آفات، عدم تأثیر نامطلوب روی محیط زیست و جانداران غیرهدف جایگاه ویژه‌ای را در مدیریت تلفیقی آفات دارد (Kurstak & Tijssen, 1982). باکتری *B. thuringiensis*، یک باکتری گرم مثبت، اسپوردار و متحرک با تاژک جانبی است. هم‌زمان با تشکیل اسپور داخل اسپورانژیوم، پروتئین‌های کریستالی حاوی دلتا اندوتوکسین تولید می‌کند که برای برخی حشرات سمی می‌باشد. دلتا اندوتوکسین با اتصال به‌گیرنده‌های موجود روی سلول‌های اپیتلیال روده‌ی میانی حشره باعث تخریب سلولی و مرگ آن می‌شود. باکتری Bt هیچ اثر سوئی روی زنبورهای پارازیتوئید شب‌پره‌ی پشت الماسی ندارد (Brunner & Stevens, 1986)، ولی برای شب‌پره‌ی پشت الماسی که به بسیاری از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده، بسیار سمی است (Sun *et al*., 1986). از آنجایی‌که Bt میکروارگانیسم عمومی خاک بوده و در همه‌جا یافت می‌شود (Travis & O'Callaghan, 1989). لذا با مطالعات وسیع در جهت شناسایی جدایه‌های مختلف این باکتری در مناطق اکولوژیکی کشور می‌توان به سویه‌های جدیدی که با شرایط اقلیمی هر منطقه سازگاری بیشتری دارد، دست‌یافت که برای آفات کلیدی و مهم نظیر کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت الماسی مؤثر باشند، که در این راستا ده‌ها جدایه‌ی مختلف از این باکتری از خاک‌های زراعی کشور جدا شده است (Marzban & Salehi, 2006).

اغلب ژن‌های تولیدکننده‌ی دلتااندوتوکسین در *B. thuringiensis* توسط DNA خارج کروموزومی که بر روی پلاسمید در اندازه و تعداد مختلف قرار دارند، کد می‌شوند (Levinson *et al*., 1990). تاکنون تعداد زیادی ژن پلاسمیدی در ارتباط با *B. thuringiensis* شناخته شده است، که در بین ۲۱ زیرگونه‌ی بررسی شده تعداد پلاسمید از ۲ تا ۱۲ عدد در هر زیرگونه متغیر بوده است. وجود ژن کریستال پروتئینی روی پلاسمید به‌وسیله‌ی کلون کردن ژن و هیبریداسیون به‌اثبات رسیده است. ژن‌های مسئول کریستال پروتئینی می‌توانند در یک زیرگونه به شکل پلاسمیدی و کروموزومی وجود داشته باشند. اگرچه این ژن‌های کروموزومی مانند هم نبوده و ممکن است تنظیم آن‌ها متفاوت باشد. در برخی موارد ژن کروموزومی به‌صورت نهفته است که فقط در حضور ژن پلاسمیدی بیان می‌شود، تاکنون بیش از ۴۰۰ ژن مختلف در زیر گونه‌های مختلف این باکتری شناسایی شده است (Tanada & Kaya, 1993).

بررسی بیمارگری جدایه‌های Bt روی حشرات مختلف و تعیین دامنه‌ی میزبانی، انجام آزمایشات فراوانی را ایجاب می‌کند. حاصل این آزمایشات مبین قدرت عمل و خصوصیات بیولوژیک عامل بیمارگر خواهد بود. لذا لزوم برقراری روش‌های استاندارد ساده و شناخته شده برای انجام ارزیابی‌ها امری ضروری خواهد بود که تحت عنوان آزمایشات زیست‌سنجی یا Bioassay مطرح می‌شود. آزمایش‌های زیست‌سنجی جهت تشخیص تفاوت‌های بیولوژیکی بین جدایه‌های باکتری Bt و ارزیابی کیفیت و توان بیمارگری جدایه‌های این باکتری در میزبان صورت خواهدگرفت. وقتی حشره با باکتری Bt آلوده شود ممکن است واکنش‌های متفاوتی نظیر مرگ حشره، تأخیر در رشد، کاهش وزن شفیره و نیز بدشکل‌شدن حشره رخ دهد. اگر هدف از کاربرد Bt از بین بردن آفت باشد، بنابراین در

زیست‌سنجی، مرگ و میر به‌عنوان معیار قرار می‌گیرد. از نظر آماری دقیق‌ترین اندازه‌گیری پاسخ مرگ و میر جمعیّت حشره تعیین غلظتی از Bt است که ۵۰ درصد جمعیت حشره را می‌کشد، به‌عبارتی تعیین LC_{50} آن می‌باشد. در این تحقیق بیمارگری چند جدایه Bt که از بین ده‌ها جدایه‌ی بومی غربال شده‌اند (Marzban, 2001; Marzban & Salehi, 2006) روی دو حشره‌ی آفت مهم محصولات کشاورزی بررسی و جدایه یا جدایه‌های برتر معرفی شدند. همچنین شناسایی مولکولی جدایه‌های مزبور با استفاده از PCR و الکتروفورز انجام شد، که از مزایای این روش سرعت کار و حساسیت بالا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- پرورش حشرات

در این بررسی پروانه‌ی کرم قوزه‌ی پنبه از مزارع گوجه‌فرنگی گرگان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. لاروهای این حشره به‌علت هم‌خواری، به‌صورت انفرادی درون لوله‌های آزمایش (۱×۶ cm) روی غذای مصنوعی پرورش داده شدند (Teakle & Jensen, 1991). پس از دوران لاروی و شفیرگی پروانه‌ها ظاهر و در دسته‌های ۳۰ تایی (♂۱۵ + ♀۱۵) در ظروف استوانه‌ای پلاستیکی به‌قطر و ارتفاع، ۱۷ و ۲۵ سانتی‌متر قرار گرفتند سطح درونی دیواره ظروف به‌وسیله‌ی کاغذ جاذب رطوبت پوشانده شده و در کف استوانه، پتری حاوی آب و عسل ۱۰ درصد قرار داده شد. پرورش تمام مراحل رشدی آفت در اتاق پرورش با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره‌ی روشنایی به تاریکی ۱۶:۸ ساعت انجام شد. کلنی اولیه‌ی شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* از مزارع کلم اسلام‌شهر و کهریزک (جنوب تهران) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. برای تشکیل کلنی از قفس پرورش به شکل مکعب مستطیل از جنس پلکسی گلاس به ابعاد ۴۰×۴۰×۶۰ سانتی‌متر در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره‌ی نوری:تاریکی، ۱۶:۸ ساعت استفاده شد.تغذیه‌ی لاروها با استفاده از برگ‌های کلم و پروانه‌ها از محلول آب عسل ۱۰ درصد انجام شد.

۲- بررسی نوع ژن *cry* در جدایه‌های Bt

نوع سموم پروتئینی Bt در سه جدایه‌ی بومی KD2، 20، 6R و نمونه‌ی تجاری دیپل از طریق ردیابی ژن‌های *cry* در آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای استخراج DNA، در ابتدا از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت NB، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و سلول‌های باکتری به‌کمک سانتریفوژ با سرعت g ۵۰۰۰ در یک دقیقه ته‌نشین شدند. سلول‌های ته‌نشین شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم ، ۱۰ میلی‌مولار تریس و ۰/۱ درصد توئین ۲۰) سوسپانسیون شده و به‌طور مجدد سانتریفوژ شدند. سپس ویال‌ها به حمام آبی با دمای ۹۹ درجه‌ی سلسیوس منتقل شده و در نهایت رونشین حاوی DNA به ویال سترون دیگر منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. ردیابی زیرگروه‌های ژن‌های *cry* با چهار جفت پرایمر عمومی شامل جفت پرایمرهای *cry1* ، *cry2*، *cry3* و *cry4* صورت گرفت، که به‌طور خلاصه مشخصات پرایمرهای ژن‌های *cry* در این مطالعه در جدول یک آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات عمومی و خصوصی پرایمرهای ژن‌های *cry* در راسته‌ی پروانه‌ها (Ben *et al*., 1997).

Table 1- Characteuristics of general and specific primers for lepidopteran active cry-type genes (Ben *et al*., 1997).

Primers	Sequences	Product size (bp)
cry1(d)	5-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3	277
cry1(r)	5-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3	
cry2(d)	5-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3	498
cry2(r)	5-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3	
cry3(d)	5-CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC-3	1367-1392
cry3(r)	5-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3	
cry4(d)	5-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3	3762-3738
cry4(r)	5-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3	

۳- آماده‌سازی باکتری

جدایه‌های 20، 6R و KD-2 باکتری *B. thuringiensis* از بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور فراهم شد (جدول ۲). جدایه‌ها در محیط کشت LB، (tryptone 1%, yeast

extract 0.5%, NaCl 1%, pH 7–7.2) در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۴ روز با دور ۱۹۰ rpm شیک شدند. وجود اسپور-کریستال آزاد در نمونه‌ها با مشاهده‌ی میکروسکوپی تأیید شد، سپس داخل یخچال در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند (Marzban *et al*., 2009). اسپور و کریستال‌ها را داخل آب مقطر و Tween80 (به‌میزان ۰/۰۴ درصد) به‌صورت سوسپانسیون یک‌نواختی درآورده و غلظت‌های حداقل و حداکثر با زیست‌سنجی اولیه روی حشرات مذکور محاسبه، سپس با روش شمارش کلنی با رقیق‌کردن غلظت حداکثر، غلظت‌های دیگر با فواصل لگاریتمی به‌دست آمد. بدین ترتیب برای هر جدایه هفت غلظت مختلف حاصل شد.

جدول۲- مشخصات جدایه‌های Bt.

Table 2- Profile of Bt isolates.

Isolates	Host	Area of collection
20	soil of field	Mashhad
KD-2	soil of field	Kohgiluyeh-va-Boyer Ahmad
6R	soil of jungle	Rasht
Dipel	-	commercial product

٤- روش‌های زیست‌سنجی

٤-١- زیست‌سنجی جدایه‌ها با استفاده از غذای مصنوعی روی کرم قوزه‌ی پنبه

ابتدا یک زیست‌سنجی مقدماتی روی لارو ۴ روزه برای به‌دست آوردن حداقل و حداکثر مرگ و میر انجام شد. سپس هفت غلظت برای آزمون زیست‌سنجی به‌منظور محاسبه LC_{50} بر اساس روش مرزبان (2001) تعیین شد. در این روش سه جدایه‌ی بومی و یک جدایه تجاری (Dipel®)، با استفاده از غذای مصنوعی روی لارو سن دو (چهار روزه) کرم قوزه‌ی پنبه آزمایش و میزان بیمارگری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تکه‌های غذای مصنوعی به‌وزن یک گرم بریده شد و روی سطوح هر تکه غذا با استفاده از سمپلر مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده ریخته، سپس داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شدند. لازم به ذکر است که آغشته کردن سطوح غذا از تیمار شاهد شروع و به تیمارهای با غلظت بالاتر برای کاهش خطا انجام شد. برای هرغلظت، ۴۵ لوله آزمایش در سه تکرار ۱۵ تایی تدارک دیده شد، در هر لوله آزمایش یک لارو چهار روزه که هم‌زمان تفریخ شده بودند و از نظر رنگ و اندازه یکسان بودند (Evans & Shapiro, 1981) توسط قلم‌مو روی غذای تیمار شده داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شدند (Hughes *et al*., 1984) پس از ۴۸ ساعت که لاروها از غذای آلوده به باکتری تغذیه کردند، به لوله‌های آزمایش مشابه دارای غذای سالم و عاری از Bt انتقال یافتند (Kumar *et al*., 2008). میزان مرگ و میر لاروها تا هفت روز از شروع آزمایش ثبت گردید. معیار مرگ و میر لاروها، سیاه‌شدن و عدم واکنش لارو به ضربه‌ی سوزن بود.

٤-٢- زیست‌سنجی جدایه‌ها با استفاده از غذای طبیعی روی شب‌پره‌ی پشت الماسی

برای هر غلظت سه ظرف پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ده سانتی‌متر و ارتفاع سه سانتی‌متر در نظر گرفته که برای تهویه مناسب درب ظروف سوراخ و با پارچه‌ی توری پوشانده شد. برای هر غلظت سه تکرار و در هر تکرار از دو دیسک برگی تازه کلم با قطر سه سانتی‌متر، استفاده شد. دیسک‌های برگی قبل از آغشته شدن به باکتری، به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار داده و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. روی هر سمت دیسک برگی ۱۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر ریخته و با لوپ استریل پخش تا تمام سطح برگ به باکتری آغشته گردید. برای شاهد از محلول آب و Tween 80 ۰/۰۴ درصد استفاده شد. سپس برگ‌ها را در محیطی استریل قرار داده تا سطح آن‌ها خشک شود. در هر ظرف به‌وسیله‌ی پنس استریل دو دیسک برگی تیمار شده قرار داده و در قسمت قاعده‌ای برگ برای حفظ رطوبت برگ، پنبه‌ی مرطوب قرار داده شد. درون هر ظرف به‌وسیله‌ی قلم‌موی استریل تعداد ۱۵ عدد لارو سن دوم قرار داده و سپس روی درب هر ظرف، اطلاعات مربوط به غلظت، شماره‌ی تکرار و تاریخ درج شد. در هر دو روش زیست‌سنجی ظروف در ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره‌ی روشنایی به

تاریکی ۱۶:۸ ساعت قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت که لاروها از غذای آلوده به باکتری تغذیه کردند، به ظروف آزمایش مشابه دارای غذای سالم و عاری از Bt انتقال یافتند. میزان مرگ و میر لاروها تا هفت روز از شروع آزمایش ثبت شد. معیار مرگ و میر لاروها، سیاه شدن و عدم واکنش لارو به ضربه‌ی سوزن بود. در آزمایش زیست‌سنجی اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله‌ی نرم‌افزار رایانه‌ای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقدار LC_{50} تعیین و شاخص‌های آماری مربوطه مشخص شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های زیست‌سنجی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله‌ی نرم افزار رایانه‌ای SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) جدایه‌های مختلف باکتری محاسبه و مؤثرترین جدایه‌ی باکتری مشخص شد. برای مقایسه‌ی LC_{50} جدایه‌های مختلف با هم از دو روش Overlapping و Ratio استفاده شد.

نتایج

نتایج وجود ژن *cry* در جدایه‌های Bt

نتایج محصول ناشی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *cry* نشان داد که جدایه‌های 6R و KD حاوی ژن‌های *cry1*، *cry2* و *cry3* می‌باشد. جدایه 20 حاوی دو ژن *cry1* و *cry3* بود، حضور هر چهار ژن *cry* مورد بررسی در جدایه Dipel به اثبات رسید و به‌عبارتی ژن *cry4* فقط در جدایه Dipel ردیابی شد.

مقایسه‌ی شدت بیمارگری جدایه‌های Bt روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت الماسی

نتایج نشان داد که هر چهار جدایه باکتری برای کنترل لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه مناسب هستند. نتایج به‌دست‌آمده به‌کمک برنامه‌ی کامپیوتری SAS و Probit تجزیه و معادله خط پروبیت و LC_{50} هرجدایه به‌دست آمد. پس از تعیین میزان LC_{50} برای هر یک از جدایه‌های باکتری، جدایه‌ها با هم مقایسه شدند. میزان غلظتی که در آن ۵۰ درصد جمعیت لاروی (LC_{50}) از بین رفتند برای جدایه KD2, 6R, 20 و Dipel® روی کرم قوزه‌ی پنبه به‌ترتیب $۱/۲۱\times۱۰^{۷}$، $۱/۳۱\times۱۰^{۷}$، $۸/۸\times۱۰^{۷}$ و اسپور در میلی‌لیتر $۶/۹۱\times۱۰^{۷}$ برآورد شد. جدایه‌ی KD2 در مقایسه با جدایه‌های دیگر پایین‌ترین LC_{50} را دارد، که می‌تواند به‌عنوان جدایه‌ی برتر استفاده شود. بین دو جدایه‌ی بومی KD2 و 6R از نظر مرگ و میر روی کرم قوزه‌ی پنبه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. مقادیر غلظت کشنده ۵۰ درصد برای جدایه‌ها روی لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* به‌ترتیب $۶/۱\times۱۰^{۴}$، $۲/۹\times۱۰^{۶}$، $۳/۴\times۱۰^{۳}$ و اسپور در میلی‌لیتر $۸/۸\times۱۰^{۴}$ محاسبه گردید و با توجه به اینکه مقادیر حد بالا و پایین LC_{50} جدایه‌های بومی 20، KD-2 و 6R با هم، هم‌پوشانی نداشتند، بنابراین از لحاظ سمّیت با هم اختلاف داشتند. مقدار غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) جدایه 20 باکتری *B. thuringiensis* نسبت به جدایه‌های KD-2، Dipel و 6R روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی کمتر بود (جدول ۲). لذا با توجه به نتایج، جدایه 20 به‌عنوان مؤثرترین جدایه روی شب‌پره‌ی پشت الماسی معرفی شد.

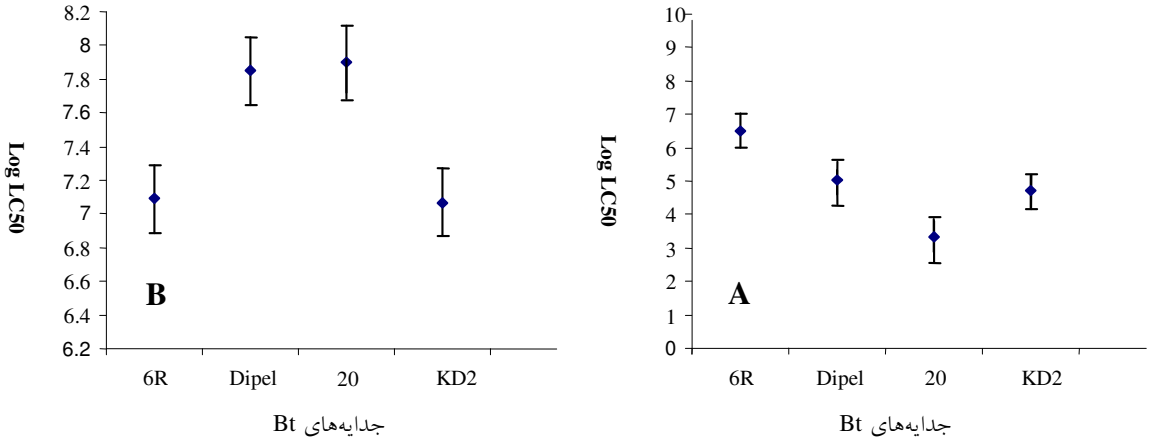
در زیست‌سنجی جدایه‌ها روی کرم قوزه‌ی پنبه دو جدایه‌ی بومی KD2 و 6R از نظر کشندگی با هم هم‌پوشانی دارند که نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار از نظر سمّیت روی لارو سن دو کرم قوزه‌ی پنبه است ولی این دو جدایه بومی با نمونه‌ی تجاری و جدایه 20 هم‌پوشانی نداشت درصورتی‌که نمونه Dipel با جدایه 20 هم‌پوشانی داشت و سمّیت نمونه‌ی تجاری و جدایه 20 از دو جدایه‌ی بومی دیگر کمتر بود (شکل ۱- B). با توجه به شکل یک در شب‌پره‌ی پشت الماسی حد بالا و پایین جدایه 20 با بقیه جدایه‌ها هم‌پوشانی ندارد. همچنین مقدار غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) جدایه KD-2 نسبت به Dipel و 6R کمتر است (جدول ۱) و این جدایه با جدایه Dipel هم‌پوشانی دارد که این نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار از نظر سمّیت روی لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* است. ولی این جدایه با جدایه‌ی 20 و 6R هم‌پوشانی نداشته و سمّیت آن از جدایه 6R بیشتر و از جدایه‌ی 20 کمتر است (شکل ۱- A). علاوه بر این جدایه‌ی

6R نسبت به جدایه‌های 20، KD-2 و Dipel بالاترین غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) را دارد (جدول ۳) و این جدایه با بقیه‌ی جدایه‌ها هم‌پوشانی نداشته که نشان‌دهنده‌ی این است که کمترین سمیّت را دارد.

جدول ۳- زیست‌سنجی جدایه‌های باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه.

Table 3- Bioassay bacteria isolates on the second larvae of Cotton Bollworm and Diamondback moth.

Pest	Isolate	LC_{50} Spore ml^{-1}	Confidence Interval (%95)		Slope	Intercept	χ^2	df	Pr>chisq
			Low. limit	Up. limit					
Diamond back moth	20	3.4×10^{3}	7.2×10^{2}	13×10^{2}	0.31	-1.11	0.63	5	0.9863
	Dipel	8.8×10^{4}	1.9×10^{4}	42×10^{4}	0.31	-1.51	0.19	5	0.9992
	KD-2	6.1×10^{4}	2.6×10^{4}	14×10^{4}	0.57	-2.71	0.77	5	0.9785
	6R	2.9×10^{6}	1.5×10^{6}	5.2×10^{6}	0.79	-5.10	0.43	5	0.9944
Cotton Bollworm	20	8.8×10^{7}	5.5×10^{7}	14×10^{7}	0.77	-6.16	2.53	5	0.9892
	Dipel	6.9×10^{7}	4.5×10^{7}	11×10^{7}	0.96	-2.56	1.43	5	0.9792
	KD-2	1.21×10^{7}	7.6×10^{6}	18×10^{6}	1.18	-3.37	2.84	5	0.9985
	6R	1.31×10^{7}	8.7×10^{6}	18×10^{6}	1.22	-3.73	1.28	5	0.9763



شکل ۱- دامنه‌ی تغییرات لگاریتم LC_{50} جدایه‌های مورد بررسی باکتری *B. thuringiensis* روی لارو سن دوم، A. شب پره‌ی پشت الماسی و B. کرم قوزه‌ی پنبه.

Fig. 1- Confidence intervals overlap of isolates LC_{50} on second larvae A. Diamondback moth and B. Cotton Bollworm .

در مقایسه‌ی Ratio، LC_{50} جدایه‌های مورد آزمایش روی کرم قوزه را بر کوچک‌ترین LC_{50} جدایه‌ی باکتری تقسیم و میزان سمیّت جدایه‌ها مقایسه شد. LC_{50} جدایه‌های 20، 6R و Dipel بر LC_{50} جدایه KD2 (کوچک‌ترین LC_{50}) تقسیم شد که جدایه‌ی KD2 ۱/۰۸، ۷/۲ و ۵/۷ بار سمی‌تر است. در شب‌پره‌ی پشت الماسی LC_{50} جدایه‌های 6R، KD-2، Dipel بر LC_{50} جدایه 20 (کوچک‌ترین LC_{50}) تقسیم شد و جدایه‌ی 20 باکتری به‌ترتیب نسبت‌به جدایه‌ی KD-2، Dipel و 6R به‌میزان ۱۸، ۲۶ و ۸۵۰ بار سمی‌تر است. این نشان‌دهنده‌ی اختلاف میزان حساسیت لارو سن دوّم شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* نسبت به‌جدایه‌ی 20 در مقایسه با سه جدایه‌ی دیگر است.

بحث

در این تحقیق اثرات قدرت بیمارگری سه جدایه‌ی بومی باکتری Bt با فرآورده تجاری Dipel روی کرم قوزه‌ی پنبه مقایسه شد. بر اساس نتایج حاصله تأثیر دو جدایه‌ی بومی Bt روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب‌پره‌ی پشت الماسی نسبت به فرآورده تجاری Dipel مرگ و میر بیشتری ایجاد کرد. جدایه‌های بومی باکتری *B. thuringiensis* را روی لارو سن سوم شب‌پره‌ی هندی، *Plodia interpunctella* (Hubner) نسبت‌به جدایه‌ی تجاری Dipel مؤثرتر اعلام کرد (Marzban, 2001). نتایج به‌دست آمده از آزمایش ما نیز نشان داد که تأثیر جدایه‌های بومی (KD-2 و 20) نسبت به جدایه‌ی تجاری بیشتر است. همچنین دیلمی در سال ۲۰۱۰ مقادیر غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) برای جدایه‌ی 20 باکتری *B. thuringiensis* را روی لارو سن دوم شب‌پره‌ی پشت الماسی، برابر با اسپور در میلی‌لیتر ۳×۱۰^{۳} اعلام کرد و نشان داد که قدرت بیمارگری این جدایه در مقایسه با جدایه تجاری Dipel بیشتر است (Izadyar, 2002). زیست‌سنجی چند جدایه‌ی بومی Bt به‌همراه فراورده‌ی تجارتی دیپل روی کرم قوزه‌ی پنبه را آزمایش و مشاهده کرد که جدایه‌ی 6R فاقد اگزوتوکسین است. در تحقیقات انجام شده باکتری *B. thuringiesis* یکی از مؤثرترین حشره‌کش‌ها علیه شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella*، سفیده کوچک کلم، *Pieris rapae* L. و کرم وجب‌کن کلم، *Trichoplusia ni* Hübner. در آمریکا معرفی شد (Eckenrode *et al.*, 1981). همچنین اثر Thuricide را با چندین حشره‌کش شیمیایی روی *P. xylostella* بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که Thuricide مؤثرتر از حشره‌کش‌های شیمیایی است (Ho and Ng, 1970). همچنین جدایه‌ی تجاری Bitrol (سروتایپ H-1) در غلظت ۱۳×۱۰^{۵} اسپور در سانتی‌مترمربع لاروهای شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* را در مدت دو روز از بین می‌برد (Rautapaa, 1967). علاوه بر این (Burgerjon & Biache, 1967) سروتایپ‌های H-1، H-3، H-4، H-5 و H-6 باکتری *B. thuringiensis* را روی شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* آزمایش کرده و همه سروتایپ‌ها را روی *P. xylostella* مؤثر اعلام کردند. در همین راستا (Ooi, 1981) تأثیر فرآورده‌های تجاری Dipel و Bactospeine را روی لاروهای سه روزه‌ی شب‌پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* بررسی و جدایه Dipel را برای کنترل این آفت مؤثرتر اعلام کرد. هر جدایه یا سروتایپ Bt می‌تواند چند نوع توکسین (Cry) تولید کند که Cry1 عموماً روی پروانه‌ها مؤثر است اما توکسین‌های دیگری نیز مانند Cry2 روی شب‌پره‌ها مؤثراند. پروانه‌ها در میان گروه توکسین‌های Cry1 نیز حساسیت یکسانی ندارند، به‌عبارتی Cry1C یا Cry1D روی شب‌پره‌ی پشت الماسی مؤثر اما روی کرم قوزه‌ی پنبه بی‌تأثیر است، و یا Cry1Aa روی شب‌پره‌ی پشت الماسی نسبت به کرم قوزه‌ی پنبه مؤثرتر است، اما هر دو گونه این حشره نسبت به Cry1Ab و Cry1Ac حساس هستند (Ben *et al.*, 1997; Eldridge, 2011) براین اساس دلیل تأثیر متفاوت جدایه‌های Bt روی گونه‌های پروانه‌ها به‌خاطر تنوع توکسین سروتایپ‌های Bt است و نشان‌دهنده‌ی تأثیر اختصاصی جدایه‌های این باکتری روی حشرات است. در بررسی مولکولی جدایه‌ها مشخص شد که جدایه‌ها دارای ژن‌های cry یکسانی نیستند و نه تنها در سطح Cry1 بلکه در سطح Cry با هم تفاوت دارند. در انتخاب جدایه‌های تجاری علاوه‌بر فاکتور پایداری ژنتیکی و توانایی تولید اگزوتوکسین بایستی به دامنه‌ی تأثیر آن جدایه توجه داشت، چرا که ممکن است برخی از پروانه‌های مضر را کنترل و برخی را مانند گونه‌های *Spodoptera* spp. به‌خوبی کنترل نکند.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند از آقای دکتر محسن فرزانه و خانم مهندس آرزو یوسفی به خاطر همکاری‌های ارزنده‌ای که در انجام این تحقیق به عمل آوردند کمال تشکر و سپاس خود را اعلام نمایند.

References

Behdad, A. 1982. Pests of Field Crops in Iran. Neshat publication, Isfahan. (In Persian).

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R. & Manasherob, R. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 63: 4883–4890.

Brunner, E. & Stevens, P.F.E. 1986. The control of diamondback moth with Thuricide, pp. 213-217. In: Talekar, N. S. & Griggs, T. D. (eds.), Diamondback Moth Management. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan.

Burgerjon, A. & Biache, G. 1967. Contribution a L'etude du spectre d'activite de different souches de *Bacillus thuringiensis.* Entomologia Experimentalis et Applicata. 10: 211-230. (In French with English summary).

Deilami, A. 2010. Bioassay studies of some *Bacillus thuringiensis* Iranian strains on larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* L. M.s. Thesis, University of Shahed, 110 pp. (In Persian).

Dezianian, A., Sajap, A.S., Lau, W.H., Omar, D., Kadir, H.A., Mohzmed, R. & Yusoh, M.R.M. 2010. Morphological Characteristics of *P. xylostella* Granulovirus and Effects on Its Larval Host Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). American Journal of Agricultural and Biological Science. 5(1): 43-49.

Eckenrode, C.J., Andaloro, J.T. & Shelton, A.M. 1981. Suppression of Lepidopterous larvae (*Pieris rapae, Plutella xylostella, Trichoplusia ni*) in commercial sauerkraut cabbage field and research plots (parathion, *Bacillus thuringiensis*). Economic Entomology. 72: 276-279.

Eldridge, R. 2011. Calidad de los Productos Formulados en base a *Bacillus thuringiensis*. http://www.anasac.cl/agropecuarios/opensite_det_20110621205036n aspx.

Evans, H.F. & Shapiro, M. 1981. Viruses, pp. 17–54. In: Lacey, L. (eds.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London.

Fitt, G. P. 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology. 34: 17-52.

Grzywacz, D., Rossbach, A., Rauf, A., Russell, D.A., Srinivasan, R. & Shelton, A.M. 2009. Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassica in Asia and Africa. Crop Protection. 29(1): 68-79.

Ho, T.H. & Ng, K.Y. 1970. *Bacillus thuringiensis* Berliner for the control of diamondback moth in West Malaysia. Malaysian Agriculture Journal. 47: 313-322.

Hughes, P.R., Gettig, R.R. & McCarthy, W.J. 1984. Comparison of the time- Mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. Invertebrate Pathology. 41: 256-261.

Izadyar, S. 2002. Bioassay of Iranian strains of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* and determination of β –exotoxin. M.s. Thesis, Reseach and Sciense of Azad University. 117 pp. (In Persian).

Kumar, N.S., Murugan, K. & Zhang, W. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus and Azadirachtin. BioControl. 53: 869-880.

Kurstak, E. & Tijssen, P. 1982. Mode of action, safety and future popects, pp. 3-45. In: Kurstak, E. (eds.), Microbial and Viral Pesticides. Marcel Dekki, Newyork.

Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C. & Gonzalez, J.M. 1990. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxins, and new exotoxins in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography. Journal of Bacteriology. 172: 3172-3179.

Marzban, R. & Baniameri, V. 2004. An investigation on the effectiveness of some chemical and biological insecticides on Diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae). Journal of New Agricultural Science. 1: 14-20.

Marzban, R. 2001. Comparative bioassay of some native isolates of *Bacillus thuringiensis* and serotype of *kurstaki* on Indian meal moth (*Plodia interpunctella* Hb.). Applied Entomology and Phytopathology. 70: 29-36.

Marzban, R. & Salehi, J.G. 2006. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soils of Iran, pp. 95-100. In: Zaikov, G.E. (eds.), Biotechnology, Agriculture and the Food Industry. Nova Science Publishers, New York**.**

Marzban, R., He, Q., Liu, X.X. & Zhang, Q.W. 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and Cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on Cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology. 101: 71-76.

Mitter, C., Robert, W.P. & Mattews, M. 1993. Biosystematic of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). Annual Review of Entomology. 38: 207-225.

Ooi, P.A.C. 1981. Microbial control of diamondback moth in Cameron Highlands, Malaysia. Malays Applied Biology. 10: 49-56.

Rautapaa, J. 1967. Notes on the toxicity of a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on some Lepidoptera and Tenthredinidae larvae. Annals of Agriculture Fennica. 6: 103-105.

Shelton, A.M. 2004. Management of diamondback moth, pp. 47-53. In: Sivapragasam, A., Loke, W.H., Hussan, A.K. & Lim, G.S. (eds.), The Management of Diamondback Moth and other Crucifer Pests. Kualalumpur, Malaysia.

Sun, C.N., Wu, T.K., Chen, J.S. & Lee, W.T. 1986. Insecticide resistance in diamondback moth, Management, PP. 359-371. Diamondback Moth. In: Talker, N.S. & Griggs, T.D. (eds.), Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan.

Talekar, N.S. & Shelton, A.M. 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. Annual Review of Entomology. 38: 275-301.

Tanada, Y. & Kaya, H. K. 1993. Insect Pathology. Academic Press, Sandiego.

Teakle, R.E. & Jensen, J.M. 1991. *Heliothis armigera*, pp. 313-332. In: Singh, p. & Moore, R.F. (eds.), Hand Book of Insect Rearing. Elsevier, Amsterdam.

Travis, R.G., & O'Callaghan, M. 1989. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Wiley, New York.

Verkerk, R.H.J. & Wright, D.J. 1996. Multitropic interactions and management of the diamondback moth, a review. Bulletin of Entomological Research. 86: 205-216.

Wright, D. 2004. Biological control of *Plutella xylostella*: a global perspective, pp. 9-14. In: Bordat, D. & Kirk, A.A. (eds.), Improving Biocontrol of *Plutella xylostella*. Montpelier, France.

Study of virulence and molecular characteristics of some *Bacillus thuringiensis* isolates on cotton bollworm and diamondback moth

Maryam Kalantari[1], Rasoul Marzban[1], Zahra Magollifard[2], Habib Abbasipour[2]

1- Department of Biological Control, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

2- Deprartmetn of Plant Protection, Faculity of Agriculture Science, Shahed University, Tehran, Iran.

Corresponding author: M. Kalantari, Email: m_kalantary2000@yahoo.com

Received: June. 06, 2013 **1 (2) 17-26** **Accepted: Dec. 22, 2013**

Abstract

Bacillus thuringiensis bacteria because of many advantages such as specific effect on pest insects larvae, no adverse effects on the environment and non-target organisms and also easy combination with other methods of pest control, has an important role in pest management programs. The first step as a basis for doing research on this bacteria is to study virulence of different isolates and strains of the pathogen in the control of the target pest. In this research, the virulence of three native isolates and a commercial product (Dipel®) was evaluated on the larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and diamondback moth, *Plutella xylostella* at 27^{oC}, a relative humidity of 65% and 16L:8D photoperiod. Based on the calculated results, 50% lethal concentration (LC_{50}) of three native isolates of KD2, 20, 6R and commercial product of Dipel on the 2nd larval instars of *H. armigera* were obtained as 1.21×10^{7}, 8.8×10^{7}, 1.39×10^{7} and 6.91×10^{7} spore ml^{-1}, respectively and KD2 isolate was the best strain among others. Results of 50% lethal concentration (LC_{50}) bioassay of three native isolates and commercial sample of Dipel on the 2nd larval instars of *P. xylostella* were calculated as 6.1×10^{4}, 3.4×10^{3}, 2.9×10^{5} and 8.8×10^{4} spore ml^{-1}, respectively and isolate of 20 was the best strain among others. The molecular analysis of the isolates revealed that isolates *cry* genes are not identical.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, virulence, molecular characteristic**.**