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

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

سمانه خیری[۱]، محمدرضا رضاپناه[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 مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا از خانواده Bacillaceae بوده که به عنوان جایگزین عملی سموم شیمیایی به‌صورت عامل بیولوژیک مؤثر در کنترل بسیاری از حشرات به‌کار می‌رود. پتانسیل‌های متفاوت این باکتری بر روی حشرات مختلف ناشی از تنوع سروتایپ‌ها و نیز تنوع سویه‌ها می‌باشد. کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) آفت خطرناک پنبه و دارای میزبان‌های متعدد است. در این تحقیق میزان مرگ و میر لاروهای کرم قوزه بر اثر دو جدایه بومی Bt که از مزارع استان‌های 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 زیست‌سنجی LC50 برای جدایه Dipel، ۶۸/۲۸۶۴ اسپور بر هر میلی‌لیتر، برای جدایه YD5، ۴۸×۱۰^{۶} اسپور بر هر میلی‌لیتر و برای جدایه BR4، ۷۷×۱۰^{۱۲} اسپور بر هر میلی‌لیتر نشان‌دهنده میزان کارائی این ایزوله‌ها 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 thuringinesis*، جدایه BR4، بوشهر، جدایه YD5، یزد، زیست‌سنجی

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه حشره‌شناسی، 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 به‌زراعی 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 بیمارگر 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 Sotto 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 (Bt) *Bacillus thuringiensis* 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 واریته 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 بوسیله باکتری Bt را مورد بررسی قرار داد. ایزدیار (۱۳۸۱) ۱۲ جدایه بومی Bt روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتااگزوتوکسین 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 ۴-۳ ×۱/۲-۱ 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). Heimple (1967) سموم قوی و شناخته شده

Bt را تشخیص و توسعه داد و حروف الفبای یونانی را برای نام‌گذاری توکسین‌ها پیشنهاد نمود. این سموم شامل: آلفااگزوتوکسین، بتااگزوتوکسین، گمااگزوتوکسین، بتااندوتوکسین و دلتااندوتوکسین می‌باشند.

طی دهه‌های گذشته تعداد زیادی از زیر گونه‌های Bt شناسایی شده‌اند. این زیرگونه‌ها تحت عناوین مختلفی نظیر Serotypes، Strains، Serovars، Crystovars و Pathovars مطرح شده‌اند. زیرگونه‌های Bt با روش‌های مختلفی از جمله تست‌های بیوشیمیایی، آنتی‌ژن تاژک‌ها، آنتی‌ژن کریستال یا پاراسپورال بادی، تولید استراز، تولید آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌ها، فاژها و گروه‌بندی لکتین متمایز می‌شوند. طبقه‌بندی زیرگونه‌های Bt براساس سروتایپ-H یا آنتی‌ژن 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 بالاخص 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 نانوایی (۳۵ گرم)، پودر جوانه گندم (۳۰ گرم)، اسید سوربیک (۱/۱ گرم)، اسید اسکوربیک (ویتامینC) (۳/۵ گرم)، متیل پارا هیدروکسی بنزوات (نیپاژین) (۲/۲ گرم)، آگار- آگار (۱۴ گرم)، روغن آفتابگردان (بدون آنتی اکسیدانت) (۵ میلی لیتر) و فرمالدئید ۳۷٪ (۲/۵ میلی‌لیتر).

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 نیپاژین 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 ۱۵سانتی‌متر 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 ۳۵×۱۷cm با دیواره پوشیده با کاغذ جذب‌کننده رطوبت قرار داده شدند. پتری حاوی آب-عسل ۱۰٪ به منظور تغذیه افراد بالغ درون استوانه‌ها درنظر

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 تفریخ 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 مبنای انتخاب جدایه‌ها، وجود ژن‌های مؤثر بر راسته بال‌پولکداران (cry 1) بر اساس تحقیقات انجام شده قبلی (صیفی، ۱۳۸۶) بود. به این ترتیب جدایه‌هایYD5 (جدا شده از خاک مزرعه یزد)، BR4 (جدا شده از خاک مزرعه کلزا، 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 ۱۶۰rpm 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 ودر 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 مبنا، 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 به‌دست 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 به‌صورت 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 لامل 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 قوزه 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 به‌صورت فرآورده تجاری دایپل ساخت کشور هلند استفاده گردید. آزمایش زیست‌سنجی ۳ بار تکرار گردید و اطلاعات به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار Probit قرار گرفت. مقدار LC50 ارزیابی و شاخص‌های آماری مربوطه مشخص گردید.

نتایج

وجود اسپور و کریستال درجدایه‌های ایرانی با تهیه اسلاید و رنگ‌آمیزی گرم مشخص وتأیید 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 به‌صورت 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 کارآیی 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

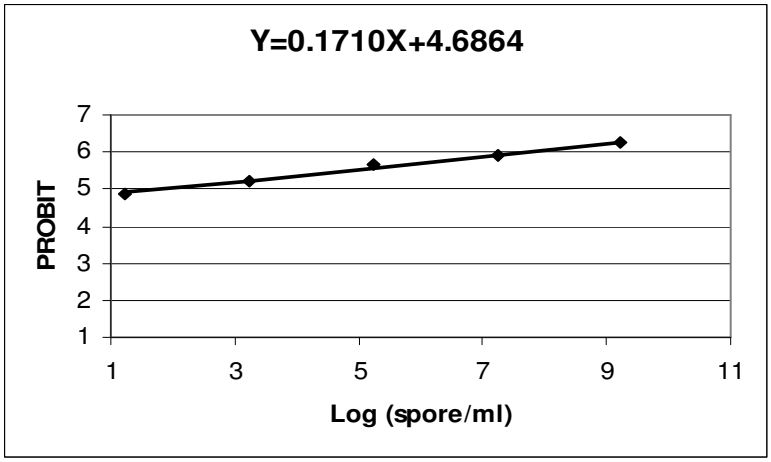
جدول ۲- نتیجه محاسبات نرم‌افزار پروبیت

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

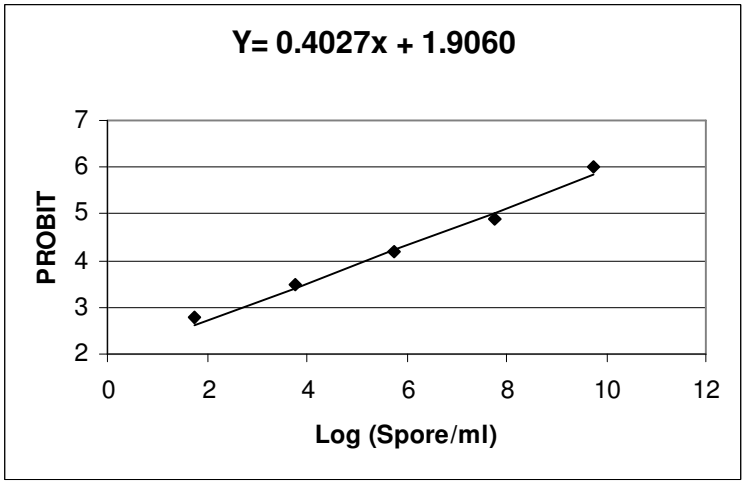
در این مطالعه غلظتی از باکتری که ۵۰٪ جمعیت لاروهای نئونات کرم قوزه پنبه را تلف می‌کرد (LC50) در مورد جدایه‌های باکتری Bt ، ۷ روز پس از آغاز زیست‌سنجی‌ها ارزیابی شد. LC50 برای جدایه Dipel، ۱۱/۷۷۹۰ اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده ۱/۵۶۱۸ تا ۲/۴۵۱۷ با اطمینان ۹۵٪)، برای جدایه YD5، 18×10^{15} اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده $31\times10^{11}\times$ تا 21×10^{7}) و برای جدایه BR4 77×10^{12} اسپور بر هر میلی‌لیتر (در محدوده

۴۸×۱۰^{۱۰} تا ۱۱×۱۰^{۱۸} با اطمینان ۹۵٪) نشان‌دهنده میزان کارائی این ایزوله‌ها می‌باشد. به‌طوری که جدایه YD5 در مقایسه با جدایه ایرانی از راندمان بهتری در ارتباط با LC50 برخوردار بوده و علی‌رغم آن‌که همچنان با فرمولاسیون تجاری Dipel فاصله معنی‌داری دارد، اثر قوی‌تری در تلفات لاروها در مقایسه با BR4 داشته است. در تعیین و مقایسه میزان کارائی 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 فعـال 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 حـساس به هر جـدایه را مشـخص کرده و ویـژگی انتخـابی هر جـدایه را از نـظـر میزبـان معـلوم کـند. در مطالعات انجـام گرفـته 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 ترکب دو جدایه باکتری با یکدیگر یا ترکیب با فرمولاسیـون اسپینـوزاد به سطح مطـلوب 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 شـده بودند، دریافتنـد که پنج نوع پروتئیـن 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 سـن دوم از سایـر سویـه‌ها موفق‌تر شناسایی شدند. همچنین مقدار LC50 برای این دو سویه به ترتیب $۶/۷ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر محلول و $۸/۶ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر محاسبـه گـردید (Polanczyk *et al.,* 2000). نتـایج حاصـل از این مطالعـه در مقایسـه با نتایج به‌دست آمده از سایر تحقـیقات 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 بالـغ گونه‌های مختلف میزبان در اثر مصرف این باکتری وجود ندارد (Ghasemi Kahrizeh 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.

منابع References

افشار، ج. ۱۳۱۷. آفات صیفی، سبزیجات، نباتات صنعتی و علوفه ایران و دفع آن‌ها. نشریه اداره کل کشاورزی. ۱۲۴ صفحه.

ایزدیار، س. ۱۳۸۱. زیست‌سنجی جدایه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه پنبه و ردیابی بتااگزوتوکسین در آن‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۱۷ صفحه.

ایزدیار، 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 تاثیر دو حشره‌کش *Bacillus thuringiensis* روی پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۷۲.

حیدری، ح. ۱۳۷۴. مقایسه دو حشره‌کش دیفلوبنزورون روی لارو سن ۵ ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم کشاورزی ایران ۲۶ (۳): ۷۳-۷۸.

رضاپناه، 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 علیزاده، 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 phlebetomine 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 pf 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 thuringinesis* var. *kurstaki* and Spinosad on three larval stages of beet armyworm *Spodoptera exigua.* Journal of Entomology and Zoology Studies4(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. Microbal and Viral insecticides. Pp: 3-45. In: Dekker, M. and Kurstak, E. (eds) **Microbal 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.

Polanczyk, 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.