مجله تحقیقات آفات گیاهی ایران
جلد ۱/ شماره ۱/ سال ۱۳۹۰

جداسازی جدایه های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک تاکستان‌های شهرستان سلماس و ارزیابی سمیت آن روی لارو و حشرات کامل *Tribolium castaneum*(Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)

مریم فروزان*[۱]، حسین نوری[۲]، محمد رضایی[۳] و محمد حسن زاده[۴]

۱، مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی ۲، استادیار موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور ۳، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی ۴، دانشجوی دکترای حشره شناسی دانشگاه ارومیه

چکیده

Bacillus thuringiensis یک باکتری گرم مثبت، اسپورزا و خاکزی است که در سراسر جهان و در بیشتر شرایط آب و هوایی یافت می شود. به دلیل وجود ژن های *vip* و *cry* و *cyt*، این باکتری پروتئین هایی تولید می‌کند که به طور اختصاصی آفات مهم محصولات کشاورزی از جمله سخت بالپوشان، بالپولکداران، دوبالان و حتی نماتدها را آلوده و کنترل می‌کند. بدین منظور سمیت ۲۵ جدایه بومی باکتری Bt جداسازی شده از خاک‌های زراعی شهرستان سلماس روی لارو و حشره کامل *Tribolium castaneum* مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه-های Bt بر اساس روش استات جداسازی شدند. ویژگی‌های مرفولوژیکی کریستال با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه شد. براساس نتایج، ۲۵ جدایه Bt جداسازی شد و ۴۰ درصد جدایه‌ها دارای کریستال پروتئین دو هرمی بودند. در مرحله حشره کامل این آفت ۴۰ درصد جدایه‌ها و در مرحله لاروی ۸ درصد جدایه‌ها به ترتیب تلفاتی بیش از۲۵٪ و ۷۵٪ نشان دادند و بطور کلی نتایج نشان داد که باکتری تاثیر قابل توجهی روی لارو و حشره کامل حشرات مورد بررسی داشت.

کلمات کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، جدایه‌ها، سمیت، *Tribolium castaneum*

* مسئول مکاتبه

مقدمه

حشرات آفت مهم‌ترین عامل محدود کننده در تولید موفق محصولات کشاورزی هستند و سالانه در مناطق مختلف حدود ۱۵ تا ۲۵ درصد محصول را از بین می‌برند (Boulter *et al.,* 1989).

وابستگی بیش از حد و استفاده‌ی بی‌رویه از آفتکش ها منجر به خسارت جبران ناپذیری به محیط زیست شده است و تداوم استفاده از حشره‌کش‌ها منجر به ظهور و گسترش مقاومت در آفات محصولات کشاورزی و ناقلین امراض انسانی می‌شود (Georghiou, 1990).

حشره *Tribolium castaneum* نیز یکی از آفات انباری مهم از نظر اقتصادی است که به طور عمده تحت کنترل شیمیایی قرار می‌گیرد (Zettler and Arthur, 2000) با این حال، افزایش مقاومت به حشره کش‌های شیمیایی همچنین وجود باقیمانده سموم بعد از کنترل، تجمع مواد سمی در بافت‌های گیاهی و بدن پستانداران و پرندگان، آلودگی آب ها و آبزیان، از بین رفتن حشرات سودمند و اختلال در تعادل اکوسیستم (Janofsky, 2006) دانشمندان را متوجه استفاده از آفت کش‌های میکربی بجای آفت کش‌های شیمیایی می‌کند (Flinn *et al.,* 2006; Kramer *et al.* 2000; Arthur, 1996). کنترل میکربی آفات محصولات کشاورزی با استفاده از بیمارگرهای حشرات از جنبه‌های اکولوژیکی استراتژی مدیریت آفات است. اگرچه ویروس و قارچ های بیمارگر هم به عنوان عوامل کنترل میکربی استفاده می‌شود اما به نظر می‌رسد *Bacillus thuringiensis* بیشترین توان را برای این منظور دارا باشد (Aronson *et al.* 1986).

Bt به صورت تجاری به عنوان موفق‌ترین عامل کنترل آفات محصولات در سراسر جهان معرفی شده است . (Carlton, 1988) Bt از باکتری‌های کریستال‌دار، دارای اسپور هوازی و گرم مثبت از خانواده Bacillaceae است (Konecka *et al.,* 2007). این باکتری طی فرایند اسپورزایی تولید کریستال پاراسپورال می‌کند که حاوی یک یا تعداد بیشتری پروتئین *cry* است و ممکن است برای راسته‌های مختلف حشرات سمی باشد (Crickmore and Zeigler, 2007). پروتئین‌های کریستالی بسیار خاص و سازگار با محیط زیست هستند. بنابراین به طور موفقیت‌آمیزی به عنوان عوامل میکربی علیه آفات پروانه‌ای، دوبالان و سخت بالپوشان استفاده می‌شوند (Feitelson,1993; Schnepf *et al.,*1998). این باکتری از زیستگاه‌های مختلف مانند خاک، گرد و غبار دانه و لاروهای بیمار و محیط پرورش کرم ابریشم گزارش شده است (Obeidat *et al.*, 2000; Dulmage and Aizawa, 1982; Smith and Couche, 1991).

بررسی‌های اکولوژیک اخیر، توزیع گسترده‌ی باکتری *Bacillus thuringiensis* را با خواص حشره‌کشی متفاوت در خاک مناطق مختلف جهان نشان داده‌اند (Delucca *et al.,* 1981; Martin and Travers, 1989). این مشاهدات بیان کرده‌اند که خاک یک منبع مطلوب برای جدایه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* است که در کنترل حشرات آفت موثر است.

در ارزیابی جدایه‌های بومی کشور چین با زیست سنجی روی شب‌پره‌ی هندی(*Plodia interpunctella*) و شب-پره‌ی برگخوار چغندرقند (*Spodoptera exigua*) مشخص شد که ۵۸ درصد جدایه‌ها برای لاروهای شب‌پره‌ی هندی و ۷۱ درصد آن ها برای لاروهای پروانه‌ی برگخوار چغندرقند سمی بودند و سبب تلفات بیش از ۶۰ درصد شدند (Hongyu *et al.,* 2000). در این تحقیق سمیت جدایه‌های بومی باکتری B*t* جدا شده از خاک باغ های انگور سلماس مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در حدود شصت نمونه خاک از باغ‌های انگور شهرستان سلماس که در آن‌ها تا به حال هیچ گونه باکتری پاشی صورت نگرفته بود، جمع‌آوری شد.

نمونه‌های خاک به وسیله‌ی کنار زدن مواد سطحی با کاردک و سپس برداشتن یک نمونه‌ی ۱۰ گرمی از عمق ۵ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک که از تابش اشعه‌ی خورشید به دور بوده به وسیله اسپاتول صورت گرفت. نمونه‌ها داخل لیوان یکبار مصرف و داخل کیسه پلاستیکی قرار داده شد و در دمای اتاق ۱۵ تا ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. جداسازی باکتری *B. thuringiensis* برای جداسازی از روش انتخابی استات سدیم (Acetate sodium selection) در غلظت ۰/۲۵ مولار استفاده شد (Travers *et al.*, 1987). استات سدیم موجب جوانه‌زنی باکتری‌های اسپوردار غیر از باکتری *B. thuringiensis* شده سپس لوله‌ها به داخل حمام آب گرم منتقل و به مدت هفت دقیقه در معرض آب با دمای ۸۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. در اثر حمام آب گرم باکتری‌های غیر اسپوردار و فرم رویشی باکتری‌های اسپوردار از بین می‌رود، در نتیجه محلول خارج شده از حمام آب گرم حاوی باکتری *B. thuringiensis* خواهد بود (Ejiofora and Johnson, 2002). ده میکرولیتر از محلول را که با روش رقیق سازی مرحله‌ای رقیق شده بود درون ظرف پتری دیش حاوی محیط مغذی[1] ریخته و داخل انکوباتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا کلنی‌ها رشد کنند.

شناسایی اولیه Bt بر اساس حضور کریستال صورت می‌گیرد که اینکار به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی صورت گرفت (Adang, 1991). سپس کلنی‌های تفکیک شده به وسیله لوپ به لوله‌های آزمایش که حاوی مقدار مساوی محیط T_3 (از ترکیب تریپتون به مقدار ۳ گرم، تریپتوز ۲ گرم، مخمّر ۱/۵ گرم، سولفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۸)، ۰/۰۰۵ گرم کلرید منیزیم و ۱۵ گرم آگار تهیه شده در یک لیتر آب مقطر) می‌باشد، پخش کرده و به مدت ۴ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. بعد از آن آزمایش‌های سمیت انجام شد. فعالیت باکتری‌های *B. thuringiensis* جداسازی شده با استفاده از شپشه آرد مورد بررسی قرار گرفت.

ویژگی‌های مرفولوژیکی کریستال: برای مشاهده کریستال پروتئین به وسیله میکروسکوپ با توجه به این‌که باکتری *B. thuringiensis* در مرحله اسپورزایی در فاز رکود تولید اسپور و کریستال می‌کند. بنابراین این زمان (کشت ۴۸ الی ۷۲ ساعت) بهترین موقع برای تهیه اسلاید میکروسکوپی و مشاهده‌ی کریستال پروتئین است (Adang, 1991). برای گروه‌بندی آن از لحاظ فرم شکلی کریستال‌ها روش‌های مختلف رنگ آمیزی وجود دارد. برای رنگ-آمیزی باکتری‌ها از محلول کوماسی برلیانت بلو استفاده شد . برای اینکار از جدایه های کشت داده شده روی محیط T_3 اسلاید میکروسکوپی تهیه شد و بعد از خشک شدن آن ها در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه در معرض محلول کوماسی‌بلو قرار گرفتند و بعد از شستشو و خشک شدن بدون استفاده از لامل و روغن امولسیون زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

تهیه محلول باکتریایی از جدایه‌ها: برای انجام تست‌های سمیت تمام سطح رویی محیط کشت توسط لوپ مناسب جمع‌آوری و در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و خوب به هم زده شد و غلظت 1×10^{9}(CFU) تهیه شد و سوسپانسیون در آزمایش‌های زیست سنجی و سمیت روی میزبان به کار رفت.

پرورش حشره میزبان: شپشه آرد از بخش بیولوژیک مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه، کلنی اولیه آن در دستگاه آنکوباتور با در دمای ۳۰±۱°C، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره زمانی شامل ۱۶: ۸ ساعت روشنایی و تاریکی روی غذای مصنوعی شامل ترکیبی از ۱۰ قسمت وزنی آرد و یک قسمت مخمر پرورش یافت. از حشرات کامل ۷-۱ روز و لاروهای سن دوم *T. castaneum* استفاده شد. جهت ارزیابی تاثیر ایزوله‌ها روی حشرات مورد آزمایش مقدار ۱/۵گرم از غذای حشرات داخل ظروف پتری ریخته شد و

1 -Nutrient agar

با سوسپانسیون ایزوله‌ها به خوبی مخلوط و بعد از ۴ ساعت خشک شدند. هر تیمار شامل ۳ تکرار بود که در هر تکرار ۱۰ عدد حشره‌ی هم سن رهاسازی شده و در کل ۳۰ حشره برای هر تیمار به کار رفت. ارزیابی مرگ و میر حشرات کامل و لاروها بعد از ۷۲ ساعت صورت گرفت.

نتایج و بحث

بعد از رنگ آمیزی و مشاهده کریستال پروتئین ۲۵ جدایه Bt مورد شناسایی قرار گرفتند و بر اساس شکل کریستال پروتئین به ۵ گروه شامل دو هرمی، کروی، بیضی، دوهرمی و بیضی و نامنظم طبقه بندی شدند، که ۱۰ جدایه دو هرمی، ۶ جدایه کروی، ۴ جدایه بیضی، ۲ جدایه دوهرمی و بیضی و ۳ جدایه نامنظم شناسایی شدند. با استفاده از کشت ۴ تا ۵ روزه جدایه‌ها روی محیط کشت T_3 و تهیه غلظت (CFU) $۱×۱۰^{۹}$ از آن‌ها، میزان سمیت این ایزوله‌ها روی حشرات کامل و لاروهای سن دوم شپشه آرد تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- درصد تلفات *Tribolium castaneum* بر حسب تعداد جدایه‌ها بعد از ۷۲ ساعت

Table 1. Percentage mortality of the *Tribolium castaneum* due to some Bt strains after 72 h

Larvae *T. castaneum*		Adult *T. castaneum*		Percentage mortality
Percentage of strains	Number of strains	Percentage of strains	Number of strains	
20	5	60	15	0-25
32	8	40	10	25-50
40	10	-	-	50-75
8	2	-	-	75-100

در بررسی جدایه‌های باکتری Bt در شرق آسیا بیشترین فرم و شکل کریستال پروتئین جدایه‌ها را دو هرمی گزارش کردند (Martin and Traverse, 1989). هم چنین از بررسی شکل کریستال جدایه‌های باکتری به دست آمده از نمونه‌های خاک، مواد انباری، بقایای حشرات و دیگر محیط-ها مشخص شد که بیشترین شکل کریستال دو هرمی بوده (Bernhard *et al.*, 1997) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در سایر تحقیقات بعد از گذشت ۷۲ ساعت مشخص شد که ۴۱/۶۶٪ جدایه ها روی حشرات کامل شپشه آرد تلفات ۷۵-۵۰ درصد را نشان دادند و روی لاروهای این حشره تلفات بین ۱۰۰-۷۵ درصد را نشان دادند (Aramideh, 2010) که با نتایج این تحقیق در مورد لاروها مطابقت دارد ولی با توجه به نوع متفاوت گونه در حشرات کامل تلفات اندکی دیده شد. همچنین باکتری B*t* را از خاک مناطق مختلف آذربایجان‌غربی جداسازی شد و مشخص گردید که بیشترین درصد تلفات در مورد حشرات کامل شپشه آرد بین ۷۵-۵۰ درصد است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (Aramideh, 2010).

در تحقیق دیگری، باکتری Bt را از خاک و زیستگاه حشرات در نیوزیلند جداسازی کرده و سمیت آن را روی لاروهای سخت بالپوش *Tenebrio molitor* بررسی کرده و دریافتند که نیم درصد جدایه ها علیه این حشره فعالیت دارد (Chilcott and Wigley, 1993). در این تحقیق نیز مشخص شد که بیشتر جدایه‌های باکتری برای حشرات کامل شپشه آرد سمیت کمی داشتند.

منابع

Adang, M. J. 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization, p. 3-24. In K. Maramosch (ed.). Biotechnology for biological control of pests and vector. CRC Press.

Aramideh, S. H. 2010. Segregation of native strain of *Bacillus thuringiensis* and identity of phenotype and genotype of them in West Azerbaijan. PhD thesis. Faculty of Agriculture, University of Urmia. 139 pp.

Aronson, A. I., Beckman, W. and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews** 50: 1–24.

Arthur, F. H. 1996. Grain Proyectants: Current status and prospects for the future. **Journal of Stored Products Research** 32: 293-302.

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

Boulter, D., Gatehouse, A. and Hilder, V. 1989. Use of Cowpea Trypsin inhibitor (CPTI) to protect plant against insect predation. **Biotechnology Advances** 7: 489-497.

Carlton, B. 1988. Development of genetically improved strains of *Bacillus thuringiensis*. In: Hedin P, Menn J, Hollingworth R (eds.) Biotechnology for Cop Protection, American Chemical Society, Washington, D. C. pp. 260-279.

Chilcott, C. N. and Wigley, P. J. 1993. Isolation and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Soil and Insect Habitats in New Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology** 61: 244-247.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson. J., Schnepf, E., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. 2007. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http: //www. lifesci. Sussex. ac. uk/ Home/ Neil Crickmore/Bt.

DeLucca, A. j., Simonson, J. G. and Larson, A. D. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. **Canadian Journal of Microbiology** 27: 865-870.

Dulmage, H. and Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: Kurstak E. (ed.) Microbial and Viral Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York pp. 209-237.

Ejifora, A. and Johnoson, T. 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 28: 284-290.

Feitelson, J. S., Payne, J. and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology** 10: 271-275.

Flinn, P. W., Kramer, K. J., Throne, J. E. and Morgan, T. D. 2006. Protection of stored maize from insect pests using a two-component biological control method consisting of a hymenopterans parasitoid, *Thelocolax elegans*, and transgenic avidin maize powder. **Journal of Stored Products Research** 42: 2218–2255.

Georghiou, G. P. 1990. Managing resistance to agrochemicals, from fundamental research to practical strategies. In: Green, M. B., Le baron, H. M. and Mobreg, W. K (eds.). ACS Symposium series, 421. American Chemical Society.

Hongyu, Z., Ziniu, Y. and Wangxi, D. 2000. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. **Crop protection** 19: 449-454.

Janofsky, M. 2006. "E. P. A. recommends limits on thousands of uses of pesticides". New York Times. Retrieved 2006-08-24.

Konecka, E., Kaznowski, A. and Ziemnickik. 2007. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. **Journal of Invertebrate Pathology** 94: 56-63.

Kramer, K. J., Morgan, T. D., Throne, J., Dowell, F. E., Bailley, M. and Howard, J. A. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. **Nature Biotechnology** 18: 670–674.

Martin P. A. W. and Travers R. S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied Environmental Microbiology** 55: 2437-2442.

Obedidat, M. Al-Momani, F. and Saadoun, I. 2000. Diversity of *Bacillus thuringiensis* in different habitats of northern Jordan. **Journal of Basic Microbiology** 40(5-6): 385-388.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. and Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62: 775–806.

Smith, R. and Couche, G. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Applied Environmental Microbiology** 57(1): 311-315.

Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. **Applied Environmental Microbiology** 53: 1263-1266.

Zettler, J. L. and Arthur, F. H. 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. **Crop protection** 19: 577-582.

Extraction of local isolates of *Bacillus thuringiensis* from vineyard soils in Salmas and evaluation of its toxicity on larva and adults of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)

M. Frouzan*[1], H. Nuri[2], M. Rezaei[3] and M. Hasanzadeh[4]

1, Researcher of Agriculture Research Center of West Azarbaijan, e-mail: maryam_fourouzan@yahoo.com, 2, Assistant Professor of Iranian Research Institute of Plant protection, Tehran, Iran. 3, Assistant Professor of Agriculture Research Center of West Azarbaijan. 4, PhD student of Entomology, University of Uromieh

Abstract

Bacillus thuringiensis is a gram-positive, spore-forming bacterium and terrcolous with abundant agricultural and scientific attractions throughout the world and are found in most climatic conditions. Due to genes Cyt, Cry and Vip proteins produced by this bacterium that infest and control specific agricultural pests including Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, and even nematodes. For this purpose, 25 strains of indigenous Bt. bacteria separated from agricultural soils (Salmas city) and the amount of their toxicity were examined on the larvae and adult of *T. castaneum*. Bt. isolates based on morphological characteristics were isolated using acetate method. The morphological characteristics of Bt. crystal were studied by light microscopy. 25 isolates of Bt. was isolated and the most commonly isolates were pyramidal shapes. In the adult stage of this pest 40 percent of the isolates and in the larval stage eight percent of isolates were showed more than 25% and 75% losses respectively. General results showed that the bacteria have significant effect on larvae and adult of examined insects.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Strains, Toxicity, *Tribolium castaneum*

*Corresponding author