Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۰، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۱

زیست‌سنجی مقایسه‌ای چند جدایه بومی *Bacillus thuringiensis* با *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki روی شب‌پره هندی

Comparative bioassay of native isolates of *Bacillus thuringiensis* and *B. thuringiensis* subsp. kurstaki on Indian meal moth (*Plodia interpunctella* Habner)

رسول مرزبان
موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی
(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۰، تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۱)

چکیده

در طول یک سال، ۷۶ نمونه خاک از جنگل‌ها و مزارع استان کرمانشاه جمع‌آوری گردید (۱۳۷۶- ۱۳۷۵). ۵۹ جدایه شبیه *Bacillus thuringiensis* به روش اوهبا و آیزاوا جداسازی شد که از میان آنها فقط یک جدایه *B. thuringiensis* تشخیص داده شد. لازم به ذکر است که هیچ‌یک از جنگل‌ها و مزارع مذکور بوسیله *B. thuringiensis* اسپور پاشی نشده بودند. جدایه مذکور با دو جدایه بومی دیگر و با سروتایپ کورستاکی به روش زیست سنجی روی لارو سن سوم شب‌پره‌هندی *Plodia interpunctella* مقایسه شدند. نتایج تجزیه و تحلیل‌های انجام یافته حاکی از آن است که جدایه‌های بومی پتانسیل بیماری‌زایی بیشتری روی لاروهای شب‌پره هندی نسبت به واریته کورستاکی دارند.

واژه‌های کلیدی: زیست سنجی، شب پره هندی، *Bacillus thuringiensis*، جداسازی

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* Br. یک باکتری گرم مثبت، اسپوردار و متحرک بوده و دارای تاژک‌های جانبی می‌باشد. همزمان با تشکیل اسپور در داخل اسپورانژیوم، تولید بلورهای

www.SID.ir

Archive of SID

سمی (Crystal) می‌کند. تشخیص *B. thuringiensis* از سایرگونه‌های باسیلوس بوسیله این بلورها که عمدتاً لوزی شکل بوده و حاوی دلتا اندوتوکسین‌اند میسر می‌باشد که خاصیت بیماریزایی روی حشرات را به *B. thuringiensis* می‌دهند (Heimpel and Angus, 1958).

باکتری *B. thuringiensis* امروزه به عنوان یک فرآورده حشره‌کش بیولوژیک موفق در بین سایر ترکیبات حشره‌کش بیولوژیک مطرح بوده که برای اولین بار در سال ۱۹۰۱ ایشاواتا (Ishawata, 1901) باکتری اسپوردار هوازی را از کرم ابریشم بیمار جدا و آنرا Sotto bacillus یا Sudden collapse bacillus نام نهاده که بعد برلینر (Berliner, 1911) در ناحیه Thuringia در کشور آلمان باکتری مشابهی را از پروانه آرد گندم (*Anagasta kuehniella*) جدا و در سال ۱۹۱۵ آنرا *B. thuringiensis* نام‌گذاری می‌کند. متس (Mattes, 1927) با جداسازی مجدد آن، اطلاعات بیشتری را در مورد آن بیان نمود. نامبردگان متوجه شدند که محیط کشت حاوی اسپور دارای اجسام نامنظم لوزی شکل است ولی خاصیت سمی آن در سال ۱۹۵٦ بوسیله آنگوس (Angus, 1956) گزارش گردید. تا سال ۱۹۷۷ تنها ۱۳ واریته *B. thuringiensis* توصیف شده بود که همه آنها روی بال‌پولک‌داران مؤثر بودند اما از سال مذکور تا ۱۹۸۳ واریته‌های *B. thuringiensis* مؤثر روی راسته‌های دو بالان و سخت بال‌پوشان شناسایی گردید. درحال حاضر بیش از هشت صد جدایه *B. thuringiensis* از خاک، شاخ و برگ گیاهان، مواد انباری و غیر و جدا و بیش از ٦۹ واریته برای آن شناسایی شده‌اند. مطالعاتی که روی خاک‌ها انجام گرفته نشان می‌دهد که *B. thuringiensis* از تعداد زیادی از خاک‌ها بدست آمده ولی در برخی کشورها از تعداد معدودی از خاک‌ها باکتری *B. thuringiensis* جدا شده است. در آمریکا از ٤٦۳۷۳ جدایه که کلنی آنها شبیه به *B. thuringiensis* بود تنها دویست و پنجاه جدایه از آنها *B. thuringiensis* تشخیص داده شدند. یعنی فقط ۰/۵ درصد آنها *B. thuringiensis* بودند (Delucca *et al.*, 1981). از خاک‌های زراعی بنگلادش در مجموع ٦۵۰ جدایه *B. thuringiensis* جدا گردید و مشخص شد که در تمام خاک‌های زراعی بنگلادش، این باکتری پراکنش دارد که فراوانی آن در خاک‌های بنگلادش بیشتر از سایر کشورهای مطالعه شده دردنیا است (Anwar Hossein *et al.*, 1997).

www.SID.ir

Archive of SID

در این بررسی، هدف مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های داخلی و خارجی ضمن بررسی پراکنش و فراوانی باکتری *B. thuringiensis* در خاک‌های جنگلی و زراعی استان کرمانشاه بوده و مقدمه‌ای برای بررسی پراکنش باکتری مذکور در خاک‌های ایران می‌باشد.

روش بررسی

الف- جداسازی

از مناطق جنگلی استان کرمانشاه ۵۱ نمونه و از زمین‌های زراعی ۲۵ نمونه خاک هر کدام به مقدار ۲۰۰ گرم (از سطح خاک تا عمق ۲۰ سانتی‌متری) جمع‌آوری و در آزمایشگاه مطابق روش اوهبا و ایزاوا (Ohba and Aizawa, 1985) یک گرم از نمونه خاک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به حالت معلق در آمد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵° درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. آنگاه با استفاده از پیپت پاستور استریل بصورت خطی روی آگار غذائی (Nutrient agar) کشت داده شدند. سپس کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ روز در انکوباتور قرار گرفتند، برای هر نمونه خاک این عمل ۳ بار تکرار گردید. در نهایت کلنی‌هایی که شبیه کلنی *B. thuringiensis* بودند (سفید و پنبه‌ای شکل با حاشیه نامنظم) پس از تهیه لام از مراحل رویشی آنها و رنگ آمیزی، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

ب- زیست سنجی

برای انجام این آزمایش از سه جدایه بومی *B. thuringiensis* (دو جدایه E4، A5 که توسط موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی جدا گردیده) که سروتایپ آنها نامشخص بود و واریته کورستاکی (از محصول تجارتی Dipel) استفاده گردید. ابتدا غلظت‌های مختلف باکتری با فواصل لگاریتمی بین حداقل و حداکثر دز ($۳*۱۰^{۸}$ CFU/ml و $٦*۱۰^{٦}$ CFU/ml) انتخاب و تهیه شد. بدین صورت که چهار جدایه فوق هر کدام در دو ظرف شیشه‌ای (پتری) حاوی آگار غذایی (N.A) بصورت خطی در تمام سطح ظرف با رعایت شرایط استریل کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۷ روز نگهداری و بعد از این مدت کلنی‌های اسپوروله و کریستالیزه را داخل آب مقطر استریل بصورت سوسپانسیون یکنواختی درآورده و آنقدر باکتری به سوسپانسیون اضافه شد تا از لحاظ کدورت مانند لوله شماره یک

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد مک فارلند (McFarland Nephelometer Standard) شود (Baron and Finegold, 1990). برای تعیین دقیق تعداد اسپور زنده در سوسپانسیون فوق از روش Plate-Count استفاده شد. با در دست داشتن حداکثر غلظت در محصول اولیه و رفیق کردن آن با آب مقطر استریل، سایر غلظت‌ها نیز بدست آمد. بدین صورت برای هر جدایه و سروتایپ هشت غلظت مختلف با فواصل لگاریتمی حاصل شد. در زیست سنجی لاروها از روش جانسون و همکاران (Johnson *et al.* 1990) با کمی تغییر استفاده گردید. بدین صورت که برای هر غلظت ۱۵ عدد تیوب فیلم عکاسی آماده شد، به این ترتیب برای هشت غلظت و یک شاهد در هر جدایه ۱۳۵ تیوب و در کل برای چهار تیمار ٥٤٠ عدد تیوب مهیا و سپس اطراف تیوبها را با سوزن کوچکی سوراخ نموده (حداقل ۲۰ سوراخ برای هر تیوب) و در داخل هر تیوب یک تکه سیب (رقم Golden) به ابعاد تقریبی ۲ میلی‌متر و وزن ۸ تا ۱۰ میلی‌گرم قرار داده شد. بوسیله میکروپیپت به مقدار دو میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری از غلظت‌های مذکور روی هر برش سیب در داخل تیوب قرار داده شد. برای شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. بعد از ٢٤ ساعت که سطح برش‌های سیب خشک شد، به داخل هر تیوب یک عدد لارو سن سوم شب پره هندی (*Plodia interpunctella* Habner) اضافه گردید (لاروها کاملاً سالم و از هر لحاظ دارای شرایط یکسانی بودند) و برای جلوگیری از فرار لاروها در تیوب‌ها را بسته، سپس به انکوباتور (دمای ۱ ± ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ تا ٦٠ درصد) منتقل شدند.

آزمایش در دو تکرار زمانی انجام گرفت. هر چهار روز تا ظهور حشرات کامل تیوب‌ها بررسی و میزان مرگ و میر لاروها ثبت گردید. لاروهایی که برش‌های سیب آغشته به *B. thuringiensis* را خورده بودند، مقداری مغز پسته در اختیارشان قرار گرفت. زمان زیست سنجی حدود ۲۵ روز طول کشید. بعد از این مدت درصد مرگ و میر لاروها در هر تیمار از نسبت لاروهایی که تبدیل به حشره کامل شده بودند محاسبه، سپس درصد مرگ و میر تیمارها با استفاده از فرمول آبوت اصلاح و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

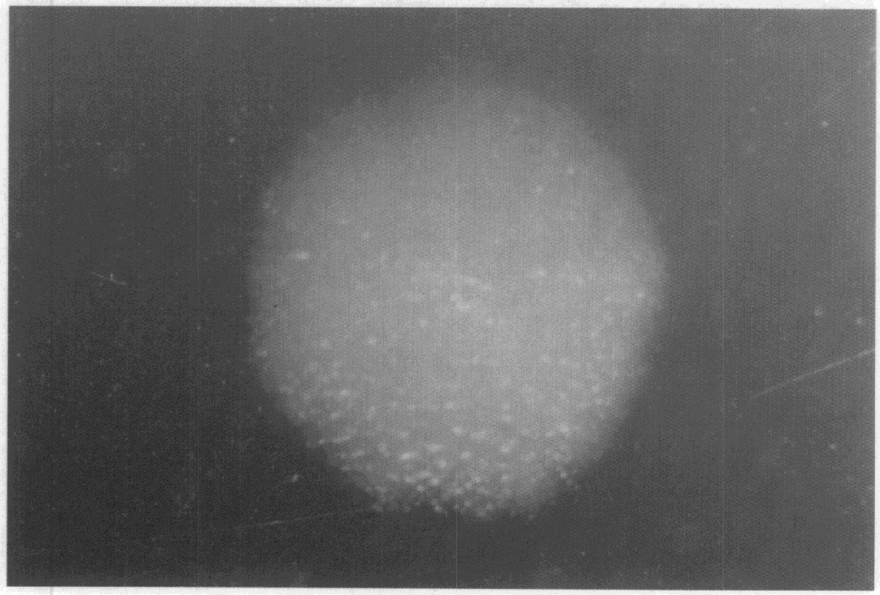
نتایج

از ۵۱ نمونه خاک جنگلی ۳۰۰ جدایه باکتری جدا گردید که ۲۰ جدایه شبیه *B. thuringiensis* بودند، با بررسی‌های نهایی هیچ‌کدام *B. thuringiensis* نبودند، از ۲۵ نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

خاک زراعی ۳۹ جدایه شبیه *B. thuringiensis* حاصل شد که از میان آنها فقط یک جدایه *B. thuringiensis* تشخیص داده شد* (شکل ۱ و۲). این باکتری بعد از ۲٤ ساعت رشد در شرایط ۳۰ سانتی‌گراد در محیط کشت N. Agar اسپورهای آن تندش و میلیون‌ها باکتری جوان حاصل شد. بعد از ٤۸ ساعت اسپور در داخل سلول برخی از باکتری‌ها بوضوح دیده شد، که اندازه آن ۱/۵-۲ میکرون بود. اسپور از لحاظ قرار گرفتن در داخل باکتری نیمه انتهایی است. در روز سوم تعداد کمی از باکتری‌ها لیز شده و اسپور و کریستال خود را در داخل محیط کشت آزاد کردند. در روز چهارم تعداد اسپور و کریستال‌های آزاد شده در محیط کشت ازدیاد یافته و به همین صورت تا روز هفتم تمام باکتری‌ها تبدیل به اسپور شدند و در محیط کشت، فقط اسپور و کریستال دیده شد. تقریباً به همان نسبت که اسپور دیده می‌شد کریستال نیز وجود داشت که این نشان می‌دهد در زمان تشکیل اسپور حداقل یک کریستال



شکل ۱، کلنی جدایه *Bacillus thuringiensis* کرمانشاه.

Fig. 1, Colony of *Bacillus thuringiensis* isolate from Kermanshah (Original figers).

* این جدایه توسط پروفسور Ohba از دانشگاه کیوشو ژاپن سروتایپ kurstaki تشخیص داده شد

www.SID.ir

Archive of SID

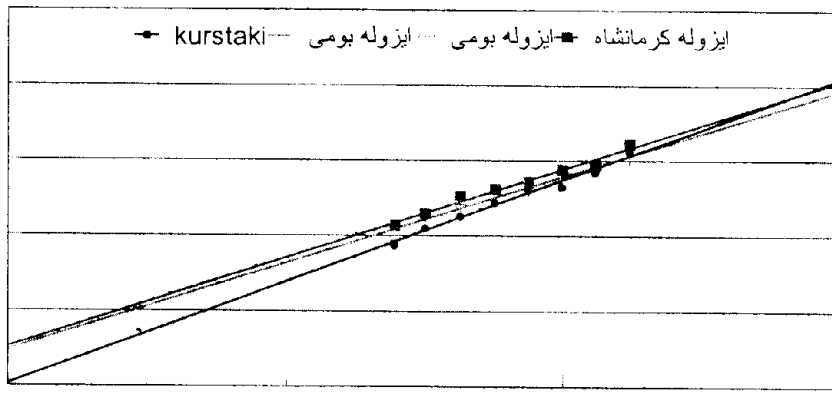
(Parasporal body) در باکتری تشکیل می‌شود. معمولاً کریستال‌ها بزرگتر از اسپورها بود و اندازه آنها ۱-۳ میکرون بود. LC50 جدایه کرمانشاه و دو جدایه بومی دیگر به ترتیب $۲/۲۱ \times ۱۰^{۷}$ ، $۲/۳٦ \times ۱۰^{۷}$ و $۳/۰۲ \times ۱۰^{۷}$ لارو/CFU می‌باشد که بین آنها اختلاف زیادی وجود ندارد اما LC50 سروتایپ کورستاکی (Dipel) $٤/٤۳ \times ۱۰^{۷}$ لارو /CFU است که تقریباً دو برابر جدایه‌های بومی می‌باشد (شکل ۲). اشتباه استاندارد Log LC50 در هر چهار تیمار تقریباً ۰/۰٤ بود که بسیار مناسب است و کای اسکویر بدست آمده حداکثر ٤/٦ است که با توجه به کای اسکویر جدول معنی‌دار نمی‌باشد همچنین اطلاعات بدست آمده از تجزیه پروبیت نشان می‌دهد که روند نسبتاً یکنواختی با توجه به غلظت‌های لگاریتمی در مرگ و میر لاروها وجود دارد.

شکل ۲، کریستال، اسپور و سلول‌های رویشی جدایه *Bacillus thuringiensis* کرمانشاه (بزرگ نمایی 1000x)

Fig. 2, Crystal, Spore and Vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* isolate from Kermanshah (Original figers-1000x).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳، پروبیت درصد تلفات جدایه‌های بومی و سروتیپ کروستاکی باسیلوس تورینژینسیس روی لارو سن سوم شب پره هندی

Fig. 3- The Probit of mortality of native isolates of *B. thuringiensis* and var. kurstaki on third instar larva of *Plodia interpunctella*.

بحث

دربررسی خاک‌های امریکا ۰/۵ درصد جدایه‌های شبیه *B. thuringiensis* تولید بلور سمی کردند یا به عبارتی *B. thuringiensis* بودند (Delucca *et al.* 1981) و در بررسی خاک های ژاپن این درصد ۲/۷ بوده است (Ohba and Aizawa, 1985). در مجموع ۵۸ جدایه *B. thuringiensis* از خاک‌های مناطق مختلف کره جدا گردیده (Ho San *et al.*1998). طبق مطالعات ما از ۲۰ جدایه شبیه *B. thuringiensis* خاک های جنگلی هیچ جدایه‌ای از باکتری *B. thuringiensis* تشخیص داده نشد اما از ۳۹ جدایه شبیه *B. thuringiensis* خاک‌های زراعی یک جدایه *B. thuringiensis* تشخیص داده شد یعنی از مجموع ۵۹ جدایه شبیه *B. thuringiensis* تقریبا ۱/۷ درصد *B. thuringiensis* بودند. با توجه به اینکه مهمترین عامل بقاء و دوام

www.SID.ir

Archive of SID

B. thuringiensis در خاک، مواد غذایی قابل دسترس می‌باشد (West *et al.* 1985) و نظر به اینکه جنگل‌های استان کرمانشاه عموماً دارای خاک های سبک و از نظر مواد غذایی فقیر هستند، به همان نسبت احتمال حضور *B. thuringiensis* در آنها نسبت به خاک‌های زراعی که از نظر مواد غذایی غنی می‌باشند کمتر است. ظاهراً *B. thuringiensis* با توجه به موقعیت و شرایط جغرافیایی منطقه حضور آن در تمام مناطق و نواحی یکسان نیست.

روش زیست سنجی که مورد استفاده قرار گرفته در حقیقت بر اساس روشی است که اولین بار جانسون و همکاران (Johnson *et al.* 1990) استفاده کردند. آنها اثبات کردند که این روش یعنی زیست سنجی انفرادی در مقایسه با روش‌های مرسوم سریعتر، دقیقتر و نتایج مطلوبتری به همراه دارد. آزمایشات ما نیز ضمن تائید این مسئله اثبات نمود که جدایه‌های بومی *B. thuringiensis* در مقایسه با سروتیپ کورستاکی سمیت بیشتری روی لاروهای شب‌پره هندی دارند. در نتیجه می‌توان جدایه‌های بومی مناسب را از مناطق مختلف کشور جدا و ضمن نگهداری و حفظ منابع ژنتیکی کشور آنها را در مسیر تولید انبوه قرار داد.

نشانی نگارنده: مهندس رسول مرزبان، بخش تحقیقات بیولوژیک، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱٤٥٤، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.

www.SID.ir