Archive of SID

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (۱۷۲-۱۶۷)

مقاله کوتاه

مقایسهٔ قدرت بیمارگری چند جدایه از باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌دست‌آمده از زیستگاه‌ها و میزبان‌های متفاوت روی بید کلم *Plutella xylostella* (Lep.:Plutellidae)

۱. آیدا خرم‌نژاد؛ ۲. رضا طلایی حسنلویی*؛ ۳. اکبر قاسمی کهریزه
۱. دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار گروه گیاه‌پزشکی واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۱۲)

چکیده

با توجه به اهمیت باکتری *Bacillus thuringiensis* در کنترل میکروبی آفات، تلاش شد تا سویه‌های بومی از این باکتری جمع‌آوری و زهرآگینی آن‌ها روی لارو شب‌پرهٔ پشت‌الماسی بررسی شود. نمونه‌های خاک از جنگل، باغ، مزرعه، لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی از چند استان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی باکتری از نمونه‌های خاک با روش انتخابی استات سدیم و برای جداسازی از لاروهای مرده، کالبدشکافی‌شدهٔ میزبان انجام شد. کلنی‌های رشدیافته روی محیط کشت براساس رنگ، شکل، نحوهٔ رشد، حاشیه و سطح کلنی توصیف و جداسازی شدند. اسلاید میکروسکوپی از هر کلنی تهیه و اسپور و کریستال باکتری با میکروسکوپ مشاهده شد. همچنین، برای تمامی کلنی‌ها، آزمون کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. قدرت بیمارگری جدایه‌ها، در غلظت 10^6 (سلول در میلی‌لیتر) روی لاروهای سن دوم شب‌پرهٔ پشت‌الماسی بررسی شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده جدایه‌های باکتری Bt از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی بسیار متنوع بودند. شدت بیماریزایی جدایه‌های باکتری Bt به سه سطح کم، متوسط و زیاد تقسیم‌بندی شدند. نتایج حاصل از این تحقیق به شناسایی ده جدایه از باکتری Bt انجامید که باعث مرگ‌ومیر بسیار زیادی روی لارو پروانه‌ها می‌شوند.

کلیدواژگان: جداسازی، زهرآگینی، *Bacillus thuringiensis*، *Plutella xylostella*.

مقدمه

شب‌پرهٔ پشت‌الماسی یا بید کلم، *Plutella xylostella* L. (Lep.:Plutellidae) حشره‌ای با پراکنش جهانی است که در سراسر مناطق معتدله و حاره در آمریکا، اروپا، جنوب شرق و غرب آسیا، استرالیا و نیوزلند آفتی بسیار مهم محسوب می‌شود (Abro 1992). دامنهٔ میزبانی بید کلم محدود به خانوادهٔ چلیپاییان است (Talekar and Shelton 1993). لاروهای خیلی ریز بید کلم به رنگ سبز روشن در سطح زیرین برگ، دالان باریکی حفر و از پارانشیم آن تغذیه می‌کنند. لاروهای درشت‌تر می‌توانند

* تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۱۴۱
E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

در تراکم بالا، به‌طور کامل بافت برگ را نابود کنند. این حشره دورهٔ وقفهٔ زندگی یا دیاپوز ندارد و در نقاط گرمسیری تا ۱۲ نسل از آن دیده شده است (Talekar *et al.* 1993). این ویژگی سبب شده است که به خیلی از آفت‌کش‌های شیمیایی متداول مقاومت پیدا کند. بنابراین، در مدیریت جمعیت بید کلم به استفاده از عوامل میکروبیولوژیک، به‌ویژه باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt)، توجه خاصی می‌شود.

B. thuringiensis یک باکتری همه‌جازی، گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و تشکیل‌دهندهٔ اسپور درونی مقاوم به حرارت است که در طی اسپورزایی کریستال‌های پروتئینی سمّی تولید می‌کند (Glare and O'Callaghan 2000). آندوسپور بیضوی نیمه‌انتهایی در این گونه، باعث تورم سلول باکتری میله‌ای شکل نمی‌شود. حشره‌کش‌های زیستی بر پایهٔ Bt برای کنترل برخی گونه‌های حشرات در راسته‌های پروانه‌ها، سوسک‌ها و دوبالان توسعه یافته‌اند (Lacey *et al.* 2001). به نظر می‌رسد باکتری Bt در بسیاری از محیط‌های زیستی به‌صورت بومی وجود دارد (Apaydin *et al.* 2005). در ایران، جدایه‌های بومی *B. thuringiensis* از محیط‌های زیستی نظیر خاک، لاشهٔ حشرات، بقایای گیاهی، آب‌های جاری و گرد و خاک انبارهای مواد غذایی از زیستگاه‌های مختلف در بیشتر استان‌های ایران از جمله آذربایجان غربی، خراسان، لرستان، تهران، قزوین، آذربایجان شرقی، مازندران، همدان و کرمانشاه جداسازی شده است (Izadyar *et al.* 1998, Marzban 2002, Aramideh *et al.* 2010, Keshavarzi 2008). جداسازی عموماً با استفاده از حرارت برای جداکردن اسپورها، گاهی با استفاده از استات سدیم (Travers 1987) یا آنتی‌بیوتیک انتخابی انجام می‌شود (Saleh *et al.* 1969).

در این تحقیق بر آن شدیم که به جداسازی و شناسایی جدایه‌های بومی از محیط خاک و لاشهٔ حشرات اقدام و تأثیر این جدایه‌ها را روی بید کلم بررسی کنیم. هدف اصلی از انجام این پژوهش، تلاش برای دستیابی به جدایه‌های بومی با قدرت بیمارگری مؤثر روی لارو بال‌پولک‌داران بود. بنابراین، تعیین ویژگی جدایه‌های به‌دست‌آمده از خاک و لاروهای مشکوک به بیماری با شکل‌شناسی کلنی‌های باکتری، آزمون‌های مرتبط و مشاهدهٔ کریستال و اسپور باکتری انجام شد و شدت بیمارگری هریک از جدایه‌ها روی لارو سن دوم بید کلم به‌دلیل اهمیت اقتصادی این آفت، تعیین شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌ها که شامل صد و چهل و هشت نمونهٔ خاک از جنگل، باغ و مزرعه و دو نمونه از لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی از استان‌های گیلان، مازندران، آذربایجان‌غربی و البرز جمع‌آوری و درون کیسه‌های پلاستیکی یا لوله‌های شیشه‌ای به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از خاک با روش انتخابی استات سدیم (Travers 1987) و در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۳۵ مولار جداسازی شدند. برای جداسازی و شناسایی باکتری از لاروهای جمع‌آوری‌شده، ابتدا لاروها استریل سطحی شدند و سپس، با یک اسکالپل استریل بدن لارو شکاف داده شد و محتویات بدن لارو به محیط کشت NA منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت نگه‌داری در انکوباتور در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، در صورت آلوده‌بودن لاروها به Bt، کلنی‌های سفید تا شیری رنگ در سطح محیط ایجاد می‌شد که با تهیهٔ اسلاید و مشاهدهٔ اسپور و کریستال، شناسایی باکتری انجام شد.

تعیین ویژگی جدایه‌ها

کلنی‌های رشدکرده روی محیط کشتNA ، براساس رنگ، شکل، نحوهٔ رشد، حاشیه و سطح کلنی توصیف و جداسازی شدند؛ هر کلنی در ظرف پتری جدیدی کشت داده شد. رنگ‌آمیزی گرم روی کشت‌های ۱۸ ساعته از جدایه‌های باکتری انجام شد. همچنین، آزمون کاتالاز (Martin and Travers 1989) برای تمامی جدایه‌ها انجام شد.

مشاهدهٔ اسپور و کریستال

برای اطمینان از اینکه کلنی‌های رشدکرده روی محیط کشت NA، باکتری *B. thuringiensis* هستند، اسلاید میکروسکوپی از باکتری تهیه شد. برای تهیهٔ اسلاید، ابتدا جدایه‌ها روی محیط NA کشت داده شدند و

www.SID.ir

Archive of SID

به‌مدت ۴ الی ۵ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری و سلول‌های باکتری باسیلی شکل حاوی اسپور و کریستال، از نظر شکل و نوع کریستال‌ها با میکروسکوپ معمولی و فاز ـ کنتراست، بررسی شدند.

آزمون کشندگی جدایه‌ها

بید کلم در اتاقک رشد، با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس پرورش داده شد. حشرات کامل بید کلم با آب عسل ۱۰ درصد و لاروهای آن، از گیاه کلم چینی تغذیه شدند. به‌منظور هم‌سن کردن لاروها، تخم‌های ۱۲ ساعته از حشرات کامل بید کلم گرفته می‌شد. تأثیر کشندگی جدایه‌ها و مقایسهٔ قدرت بیمارگری آن‌ها فقط در غلظت 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر روی لاروهای سن دوم بید کلم و در سه تکرار انجام شد. به این ترتیب شدت بیمارگری شصت و هشت جدایه از باکتری Bt آزمون و بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند. برای دو جدایه از باکتری Bt به‌دست‌آمده از لاروهای آلوده *Plodia interpunctella* و *Ectomyelois ceratoniae*، زیست‌سنجی با غوطه‌وری دیسک‌های برگی در پنج غلظت 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 سلول بر میلی‌لیتر، در سه تکرار انجام شد. مقدار LC_{50}مربوط به جدایهٔ Bt-IP روی لارو سن دوم شب‌پرهٔ پشت‌الماسی با استفاده از برنامهٔ Polo-Plus محاسبه شد. در مورد جدایهٔ حاصل از لاروهای آلوده *E. ceratoniae*، زیست‌سنجی در دو غلظت 10^6 و 10^7 سلول بر میلی‌لیتر روی تمامی سنین لاروی نیز انجام شد. به هر ظرف ۲۰ عدد لارو سن دوم بید کلم اضافه شد. ۲۴ ساعت بعد از تغذیهٔ لاروهای سن دوم بید کلم از برگ آلوده به Bt، دیسک‌های برگی سالم که به Bt آغشته نشده بودند، در اختیار لاروها قرار گرفت. تعداد مرده‌ها در هر ظرف، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلوده‌کردن برگ‌ها، شمارش و ثبت شد. این آزمایش روی شصت و هفت جدایهٔ بومی از Bt و سه جدایهٔ Bt استاندارد *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*، *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* و *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* تهیه‌شده از دانشگاه صنعتی تبریز ترکیه انجام شد. بعد از آزمون نرمالیتی داده‌ها، تجزیهٔ واریانس با نرم‌افزار آماری SYSTAT 12 و مقایسهٔ میانگین بین تیمارها با آزمون توکی انجام شد.

نتایج

تعیین ویژگی جدایه‌ها

کلنی‌های رشدکرده روی محیط کشت NA درون ظروف پتری، براساس رنگ، شکل، نحوهٔ رشد، حاشیه و سطح کلنی توصیف و جداسازی شدند. تمامی جدایه‌های مورد بررسی بعد از رنگ‌آمیزی گرم، به رنگ بنفش درآمدند و این نشانگر گرم مثبت بودن جدایه‌های مورد آزمون بود. بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی از افزودن مقدار ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد به سطح کلنی‌های باکتری درون محیط کشت، حباب‌های O_2 در سطح کلنی‌ها تشکیل شد که بیان‌کنندهٔ کاتالاز مثبت‌بودن این جدایه‌ها بود. در صد و پنجاه و پنج نمونه از کلنی‌های باکتریایی جداشده، حضور سلول‌های باکتریایی باسیلی شکل، اسپور و کریستال مشاهده و تأیید شد.

کشندگی جدایه‌ها

نتایج مربوط به آزمون کشندگی جدایه‌ها به‌صورت میانگین درصد مرگ و مقایسهٔ آن‌ها به‌روش توکی در جدول ۱ آمده است. بیشترین و کمترین درصد مرگ ایجادشده توسط جدایه‌های باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سن دوم بید کلم به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های Bt-IP و Bt-IE با ۱۰۰ درصد مرگ و جدایه‌های Bt-MoL و Bt-KhF3a با ۱۱ درصد مرگ است. نتایج اثر دو جدایهٔ Bt-IE و Bt-IP روی لاروهای سن دوم شب‌پرهٔ پشت‌الماسی نشان داد که جدایهٔ Bt-IE در تمامی پنج غلظت انتخابی (10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 سلول بر میلی‌لیتر)، مرگ ۱۰۰ درصد ایجاد می‌کند. بنابراین، برای این جدایه LC_{50} محاسبه نشد. مقدار LC_{50} حاصل از تجزیهٔ پروبیت به‌دست‌آمده برای جدایهٔ Bt-IP، $2/6\times10^4$ سلول بر میلی‌لیتر ($4/6\times10^4$-C.I. 95%1/3) بود. نتیجهٔ تأثیر دو غلظت 10^6 و 10^7 اسپور بر میلی‌لیتر از جدایهٔ Bt-IE روی لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید کلم، به این ترتیب بود که ۷۲ ساعت بعد از تغذیه از دیسک‌های برگی آلوده به باکتری Bt، در تمامی سنین لاروی تیمارشده در دو غلظت مذکور، مرگ ۱۰۰ درصدی مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. میانگین درصد (±SD) مرگ ایجادشده با غلظت 10^6cells/ml برای جدایه‌های *Bacillus thuringiensis* روی لاروهای سن دوم بید کلم

نام جدایه	میانگین درصد مرگ و گروه آماری*	نام جدایه	میانگین درصد مرگ و گروه آماری	نام جدایه	میانگین درصد مرگ و گروه آماری
Bt-NF3	a:f ۹/۳±۶۸/۴	Bt-MA	b:m ۶/۶±۴۴/۹	Bt-MG	a:h ۱۰/۲±۶۶/۷
Bt-SCa	a:j ۲/۹±۶۰	Bt-BCa	a:j ۴/۹±۵۹/۹	Bt-NoR	a:j ۳/۸±۶۰
Bt-SiF1a	a:l ۱۰/۹±۵۲/۴	Bt-SC3a	a:j ۲/۵±۵۶/۳	Bt-AR7	a:j ۶/۷±۶۰
Bt-Sif2	a:i ۵/۲±۶۴/۹	Bt-AR3a	a:g ۸/۲±۶۷/۴	Bt-MW	d:m ۳/۸±۴۰
Bt-SC5a	a:j ۴/۳±۶۲/۴	Bt-ChF	a:i ۲/۲±۶۴/۹	Bt-U2	a:k ۶/۷±۵۳/۳
Bt-NF1b	a:g ۹/۹±۶۷/۴	Bt-AR1	a:k ۴/۴±۵۷/۸	Bt-DCF	a:j ۲/۲±۶۰
Bt-QCa	b:m ۲/۵±۴۴/۹	Bt-NF4a	a:k ۷/۷±۵۵/۶	Bt-RR2	a:k ۴/۴±۵۵/۶
Bt-DP1	a:j ۴/۴±۶۲/۲	Bt-SF3a	c:m ۸±۴۲/۲	Bt-MW	a:k ۲/۲±۵۵/۶
Bt-MoCa	b:l ۲/۲±۴۸/۹	Bt-Bua	a:k ۶/۷±۵۳/۳	Bt-DPC	a:i ۸±۶۴/۴
Bt-LT	b:m ۸±۴۴/۴	Bt-ChR	c:m ۳/۸±۴۲/۲	Bt-Ch	c:m ۳/۸±۴۲/۲
Bt-ShR2	a:i ۳/۸±۶۴/۴	Bt-NF2a	d:m ۲/۴±۴۰	Bt-MoCa	b:l ۶/۷±۴۶/۷
Bt-EG2	b:l ۲/۲±۴۸/۹	Bt-MoC	b:m ۱/۵±۴۶/۷	Bt-AR8	b:m ۲/۲±۴۴/۴
Bt-kursk	a:i ۵/۹±۶۴/۴	Bt-NaF	a:k ۵۵/۶±۵/۹	Bt-IP	a ۰±۱۰۰
Bt-IE	a ۰±۱۰۰	Bt-AR4	a:e ۴/۴±۷۸/۴	Bt-U3a	a ۷/۵±۹۷/۴
Bt-AP	a:d ۱۲/۵±۸۴/۹	Bt-Sarv1	a:d ۳/۸±۸۴/۵	Bt-MCh	a:c ۲/۲±۸۸/۹
Bt-MWa	a:e ۸/۹±۷۷/۸	Bt-DAb	e:m ۲/۲±۳۵/۶	Bt-DC	a:b ۴/۴±۹۱/۲
Bt-NRa	h:m ۱/۸±۱۸/۸	Bt-DP	f:m ۲/۲±۲۲/۲	Bt-U6	e:m ۳/۸±۳۳/۳
Bt-Maa	i:m ۴/۳±۱۷/۴	Bt-BaR	m ۰±۰	Bt-AR4	d:m ۹/۶±۳۷/۸
Bt-NF1a	d:m ۹/۹±۳۷/۴	Bt-MoL	k:m ۲/۲±۱۱/۱	Bt-MC1	f:m ۴/۶±۲۴/۴
Bt-SC1	f:m ۵/۸±۲۲/۲	Bt-DAa	f:m ۳/۸±۲۶/۷	Bt-RO	f:m ۲/۴±۲۴/۴
Bt-Sarv	j:m ۲/۲±۱۵/۶	Bt-KhF3a	k:m ۲/۲±۱۱/۱	Bt-S3a	g:m ۶/۷±۲۰
Bt-CC	g:m ۳/۸±۲۰	Bt-isra	m ۰±۰		
Bt-RW	j:m ۲/۲±۱۵/۶	Bt-teneb	l:m ۲/۲±۴/۴		

* میانگین‌هایی که در بازهٔ گروه‌بندی ارائه شده است و دارای حروف یکسان و مشترک هستند با هم اختلاف معنی‌دار ندارند (Tukey-HSD, $P\geq 0/05$). گروه آماری *a:f* بیانگر *abcdef* است.

بحث

باکتری Bt توانایی زندگی در محیط زیست‌های مختلف را دارد. این باکتری را می‌توان از خاک (Travers 1987)، آب، انبار و محصولات انباری، سطح برگ درختان، زیستگاه و اجساد لارو حشرات جداسازی کرد (Hongyu 2000). خاک محیطی مناسب برای جداسازی باکتری Bt است. آپایدین در ترکیه، از خاک، غله، گرد و غبار محصولات انباری، پوشال و اجساد حشرات، شصت و یک جدایه از نود و شش نمونه جدا کرد، بیشتر جدایه‌ها از خاک به‌دست آمده بودند (Apaydin 2005). کومار از خاک مزارع پنبه تعداد هفتاد جدایه باکتری Bt میله‌ای شکل، گرم مثبت و دارای اسپور و کریستال جداسازی کرد (Kumar 2008). همچنین، در ایران، در طی سال‌های ۱۳۷۸ تا ۸۰، تعداد دو هزار و دویست و سی و چهار نمونهٔ خاک زراعی از همهٔ استان‌های ایران جمع‌آوری و تعداد صد و بیست و هشت جدایه باکتری *B. thuringiensis* جداسازی شد (Marzban 2002). در این تحقیق نیز بیشتر جدایه‌های Bt، از خاک جداسازی شده‌اند. میانگین مرگ کل در بیشترین و کمترین غلظت باکتری، سه روز پس از تیمار، در جدایهٔ Bt-IP، به‌ترتیب ۱۰۰ و ۴۱/۷ درصد بود. نتایج تحقیق ادریس و همکارانش که شدت بیمارگری باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* را روی سه سویهٔ متفاوت از شب‌پرهٔ پشت‌الماسی بررسی کردند، نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

LC_{50} این باکتری روی لاروهای مقاوم ppm ۰/۰۳۷۰۲، روی لاروهای حساس ppm ۰/۰۰۰۸۳ و روی لاروهای دورگه از استرین حساس و مقاوم ppm ۰/۰۰۱۷۴۴ بود (Idris *et al.* 2004). تانگ و همکارانش نشان دادند که LC_{50} جدایهٔ HD-1 از باکتری Bt، روی لاروهای حساس سن دوم بید کلم، $۱/۹\times۱۰^{۷}$ اسپور بر میلی‌لیتر است، اما روی لاروهای مقاوم، غلظت ۸×۱۰^{۷} اسپور بر میلی‌لیتر، تنها ۳۰ درصد مرگ ایجاد کرد (Tang *et al.* 1996). از مقایسهٔ نتایج پژوهش این محققان با این تحقیق درمی‌یابیم که کارایی جدایه‌های Bt-IE و Bt-IP، به‌کاررفته در تحقیق ما، بسیار بیشتر است یا اینکه جمعیت شب‌پرهٔ پشت‌الماسی مورد آزمون حساس است. مرگ حاصل از باکتری *B. thuringiensis* var. *kurstaki* در غلظت $۱۰^{۶}$ سلول بر میلی‌لیتر روی لاروهای بیدکلم، ۶۴/۴ درصد بود، در حالی که، در تحقیق جانسون و همکارانش (Johnson *et al.* 1991) زهرآگینی این زیرگونه روی لاروهای شب‌پرهٔ هندی در غلظت $۲/۳\times۱۰^{۶}$ سلول بر میلی‌لیتر، ۵۰ درصد بوده است. این تفاوت ممکن است به‌علت تفاوت ژنتیکی در سویه‌های مورد استفاده یا حساسیت متفاوت میزبان به باکتری باشد. براساس نتایج، می‌توان شدت بیمارگری جدایه‌های باکتری Bt را در سه سطح، تقسیم‌بندی کرد: دسته با زهرآگینی کم (کمتر از ۴۰ درصد مرگ)، دسته با زهرآگینی متوسط (بین ۴۰ تا ۷۰ درصد مرگ) و دسته با زهرآگینی زیاد (بیش از ۷۰ درصد مرگ) که از بین تمام جدایه‌ها، ۲۹/۴ درصد جدایه‌ها در دستهٔ اول یا زهرآگینی کم، ۵۵/۹ درصد در دستهٔ دوم یا زهرآگینی متوسط و ۱۴/۷ درصد در دستهٔ سوم یا زهرآگینی زیاد قرار گرفتند. ۷۱ درصد جدایه‌هایی که هونگ‌یو و همکارانش از گرد و غبار جداسازی کرده بودند، روی شب‌پرهٔ هندی *Plodia interpunctella*، ۶۰ درصد مرگ ایجاد کرد (Hongyu *et al.* 2000). درصد مرگ نه جدایه از باکتری Bt که هگاگ و همکارانش از خاک جدا کردند، روی لاروهای سن اول و دوم کرم برگ‌خوار پنبه، *Spodoptera littoralis*، به‌ترتیب ۴۷/۷ تا ۱۰۰ و ۲۵ تا ۱۰۰ درصد بود (Haggage *et al.* 2010). برودریک و همکارانش، قدرت بیمارگری فرمولاسیون تجاری (MPVII)، شامل اسپور و کریستال باکتری Bt را در غلظت ۷×۱۰^{۶} اسپور بر میلی‌لیتر روی شش گونه از بال‌پولک‌داران آزمون کردند. درصد مرگ ایجادشده توسط این فرمولاسیون روی گونه‌های *Vanessa cardui*، *Manduca sexta*، *Pieris rapae*، *Heliothis virescens*، *Pectinophora gossypiella* و *Lymantria dispar* به‌ترتیب ۱۰۰، ۸۲، ۶۲، ۹۰، ۳۶ و ۵۰ درصد بود (Broderick *et al.* 2009). نتیجهٔ کلی اینکه از شصت و هفت جدایه باکتری Bt زیست‌سنجی‌شده، ده جدایه Bt-IP، Bt-IE، Bt-AR4، Bt-U3 a، Bt-AP، Bt-AP، Bt-MCh، Bt-MWa، Bt-Sarv1 و Bt-DC، با زهرآگینی بالا، ایجاد مرگ بین ۷۸/۳ تا ۱۰۰ درصد روی لاروهای بید کلم معرفی شد. واضح است که این ده جدایه روی آفات بال‌پولک‌دار زهرآگینی زیادی داشته است و استفاده از این جدایه‌ها می‌تواند انتخاب مناسبی در کنترل بیولوژیک این آفت و حتی سایر آفات بال‌پولک‌دار باشد. البته برای نهایی‌شدن این انتخاب، لازم است که شدت بیمارگری ده جدایهٔ زهرآگین به‌ویژه Bt-IP و Bt-IE در شرایط مزرعه روی بید کلم یا سایر بال‌پولک‌داران آفت آزمون شود و در گام بعدی با تکمیل آزمون‌های ایمنی زیستی نظیر تولید اگزوتوکسین و غیره و در نهایت، در صورت مثبت ارزیابی شدن نسبت به تجاری‌سازی آن‌ها اقدام شود.

REFERENCES

Abro GH, Soomro RA, Sayed TS (1992) Biology and behavior of *Plutella xylostella*. Pakistan Journal of Zoology 24: 7-10.

Apaydin O, Fazil AY, Harsa S (2005) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grains habitats in Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 285-292.

Aramideh, S, Safaralizadeh, MH, Pourmirza, AA, Rezazadeh, M (2010) Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. African Journal of Microbiology Research 4: 1224-1236.

Broderick NA, Robinson CJ, Macmahon MD, Raffa KF (2009) Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. Biomed Central Biology 7: 11-20.

Glare TR, O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Wiley Press. 350 pp.

www.SID.ir

Archive of SID

Goa M, Li R, Die S, Wu Y, Yi D (2007) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. Biological Control 44: 380-388.

Haggag KHE, AbouYousef HM (2010) Differentiation among Egyptian *Bacillus thuringiensis* Strains at sporulation by whole cellular protein profiles. World Journal of Agricultural Sciences 6: 224-233.

Hongyu Z, Ziniu Y, Wangxi D (2000) Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. Crop Protection 49: 449-454.

Idris AB, Husaan AK, SitiHajar MT (2004) Responses of three strains of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) on *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* and Fipronil. Journal of Asia-Pacific Entomology 7: 113-117.

Izadyar S, Amirsadeghi S, Rohany H (1998) Isolation of native strains of *Bacillus thuringiensis* from soils in north of Iran. 13th Iranian Plant Protection congress 23-27 August 1998 Karaj, Iran. Volume I. P 198. (in Persian)

Johnson D E, Mcgaughey WH, Barnett DB (1991) Small scale bioassay for the determination of *Bacillus thuringiensis* toxicity toward *Plodia interpunctella*. Journal of Invertebrate Pathology 57:159-165.

Keshavarzi M (2008) Isolation, identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. Journal of Agricultural Science 10: 493-499.

Kumar D, Chaudhary K, Boora KS (2008) Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. Indian Journal of Microbiology 50: 27-32.

Lacey LA, Frutos RH, Kaya H,Vail P (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control 21: 230-248.

Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Journal of Applied and Environmental Microbiology 55: 2437-2442.

Marzban R (2002) Comparative bioassay of native isolates of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* on Indian meal moth (*Plodia interpunctella* Habner). Applied Entomology and Phytopathology 70(1): 83-90. (in Persian)

Marzban R, Salehi J (2006) Isolation of native *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural soils in Iran. Journal of New Agricultural Sciences 1: 47-54.

Saleh SM, Harris RF, Allen N (1969) Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil.Canadian.Journal of.Microbiology 15:1101-1104.

Talekar NS, Shelton AM (1993) Biology, ecology and management of the diamondback moth. Annual Review of Entomology 38: 275-301.

Tang JD, Shelton AM, vanRie J, deRoeck S, Moar WJ, Roush RT, Peferoen M (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). Applied Environmental Microbiology 62: 564-569.

Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF (1987) Selective process for efficient of soil *Bacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology 53: 1263-1266.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2015/ 2016

Short Paper

Evaluating the virulence of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from host and different habitats on diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lep.:Plutellidae)

Aida Khoramnezhad[1], Reza Talaei-Hassanloui[2*] and Akbar Ghassemi-Kahrizeh[3]

1, 2. Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran

(Received: Feb. 28, 2015 - Accepted: Nov. 3, 2015)

ABSTRACT

Regarding the importance of *Bacillus thuringiensis* isolates in microbial control, we attempted to collect native isolates and study their virulence on diamondback moth, *Plutella xylostella*. More than 148 samples were collected from Guilan, Mazandaran, West Azarbaijan and Alborz Provinces. Experimental samples including soil samples from forest, fruit gardens, agricultural fields, diseased and dead larvae, were transferred to laboratory in sterile plastic containers. The soil samples, after sieving, were processed by acetate sodium selective method at two concentrations 0.25 and 0.35 M. Insect cadaver samples were surface sterilized and dissected and body contents were placed on Nutrient agar with sterile loop. Microscopic observations, Catalase test and Gram staining were carried out for all samples. For evaluating virulence of *B. thuringiensis* isolates, a cabbage leaf dip method with 10^6 cell/ml concentration of various Bt isolates was applied. Larval mortality was recorded 72 hours after treatment. According to the results, Bt isolates varied based on morphological characteristics. All isolates were Gram-positive and catalase positive. Spores and crystals were observed in 155 Bt isolates obtained from soil and insect host. In addition, this research introduced ten strains that are highly virulent to *P. xylostella* and would be valuable as the potential biocontrol agents for controlling lepidopteran pests.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, isolation, *Plutella xylostella*, virulence.

* Corresponding author E-mail: rtalaei@ut.ac.ir Tel: +98 912 5677141

www.SID.ir