مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه ٥٤-٤١

ردیابی مولکولی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های دارای پوشش‌گیاهی مختلف

Molecular detection of the *Bacillus thuringiensis* native isolates from the soils with different vegetations

فاطمه گرایلی‌مرادی[۱]، محمود محمدی‌شریف[۲*]، علیرضا هادی‌زاده[۲] و ولی‌الله بابایی‌زاد[۲]
Fatemeh Graily Morady[1], Mahmoud Mohammadi Sharif[2*], Alireza Hadizadeh[2] and Valiallah Babaeizad[2]

۱- کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1- M.Sc of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msharif1353@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

سویه‌های بومی باکتری (Bt) *Bacillus thuringiensis* از خاک اکوسیستم‌های مختلف شهرستان‌های استان مازندران جداسازی و ژن *Cry1* عامل تولید پروتئین مؤثر بر روی حشره‌ها، در آن‌ها ردیابی شد. از ۱۲۸ نمونه خاک مورد بررسی، تعداد ٤۹۱ سویه باسیلی‌شکل به کمک بازدارندگی انتخابی استات‌سدیم جداسازی شد. با استفاده از فاز کنتراست میکروسکوپ نوری، ۲۹۳ باکتری تولیدکننده اسپور، ۸۵ باکتری تولیدکننده اسپور و Cap و ۱۱۳ باکتری تولیدکننده اسپور، Cap و کریستال شناسایی شدند که به‌ترتیب ۵۹/٦۷، ۱۷/۳۱ و ۲۳/۰۱ درصد از کل سویه‌های جداسازی شده را تشکیل می‌دادند. بررسی مولکولی ژن *Cry1* و ١٤ زیر گروه ژنی آن با استفاده از ١٤ جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. در ۱۵ جدایه ژن *Cry1* در اندازه مورد انتظار شناسایی شد. در بررسی تعیین زیرگروه‌های ژنی، ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها یافت شدند اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. در برخی از سویه‌ها ژن‌های *Cry1D*، *Cry1E* و *Cry1J* در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. این سویه‌ها ممکن است محتوی یک ژن و یا ژن‌های جدیدی باشند. یافتن سویه‌های بومی با ژن‌های مؤثر در مناطق مختلف و کاربرد آن در مهندسی ژنتیک می‌تواند در مدیریت حشره‌های آفت در آینده مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی

باکتری تولیدکننده اسپور
پروتئین کریستالی
ژن *Cry1*
سویه باسیلی
Bacillus thuringiensis

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

مقدمه

استفاده مداوم از حشره‌کش‌های سنتزی موجب بروز مقاومت در آفت‌های کشاورزی و آلودگی‌های زیست محیطی شده است. از این رو نیاز به کاربرد حشره‌کش‌های سازگار با محیط برای کاهش مقاومت حشرات آفت ضرورت یافته است (Neema *et al.*, 2010). از طرف دیگر، تمایل به کاربرد عوامل میکروبی به‌عنوان حشره‌کش افزایش یافته که یکی از موفق‌ترین این عوامل، باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) است (Obeidat *et al.*, 2004).

باکتری *B. thuringiensis* یک باکتری میله‌ای شکل، هوازی و اسپورزاست که از طریق تولید یک یا تعداد بیشتری کریستال کنار اسپوری (Parasporal Crystal) در طی دوره اسپورزایی، قابل شناسایی است. این کریستال‌ها ساختارهایی پروتئینی هستند که دلتا-اندوتوکسین(σ-Endotoxin) نامیده شده و به‌صورت اختصاصی روی بسیاری از حشرات مختلف آفت سمی هستند. دو نوع دلتا-اندوتوکسین به‌صورت پروتئین‌های کریستالی (*Cry*) اختصاصی و پروتئین‌های سیتولیتیک (*Cyt*) غیر اختصاصی وجود دارد (Martinez *et al.*, 2004).

در سال ۱۹۸۹، چهار دسته از ژن‌های *Cry* و دو دسته از ژن‌های *Cyt* توصیف شدند (Hofte & Whiteley, 1989). ژن‌های *Cry1* پروتئین‌هایی را رمزگردانی می‌کنند که روی راسته‌ی بالپولکداران (Lepidoptera) سمیت دارند؛ ژن‌های *Cry2* روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان (Diptera)؛ ژن‌های *Cry3* روی راسته‌ی سخت بالپوشان (Coleoptera)؛ و ژن‌های *Cry4* روی راسته‌ی دوبالان فعالیت دارند (Kaelin *et al.*, 1994; Crickmore *et al.*, 1998).

از سال ۱۹۸۰، استفاده از Bt به علت کاربرد آن در مهندسی ژنتیک (گیاهان تراریخته) به سرعت افزایش یافت (Rolle, 2004). افزایش فشار انتخابی و تداوم استفاده از یک نوع خاص توکسین منجر به بروز سطوحی از مقاومت در حشره‌های آفت شد. بدین ترتیب برنامه‌های غربالگری در سراسر جهان برای شناسایی سویه‌های جدید با فعالیت حشره‌کشی روی طیف وسیعی از حشرات آفت افزایش یافت (Neema *et al.*, 2010).

باکتری Bt از منابع مختلفی جداسازی شده است (خاک، لاشه حشره‌ها، برگ‌های تازه یا پوسیده، محصولات انباری)، اما نمونه‌های خاکی فراوان‌ترین و متنوع‌ترین منبع Bt هستند (Aramideh *et al.*, 2010). شناسایی ژن‌های بومی با پتانسیل حشره‌کشی بالا در سویه‌های مختلف و همچنین با دامنه میزبانی جدید و امکان انتقال آن‌ها در سویه‌های نوترکیب از طریق مهندسی ژنتیک و روش‌های انتقال ژن می‌تواند کمک شایانی برای کنترل میکروبی حشره‌های آفت و کاهش ظهور مقاومت در آن‌ها باشد.

هدف پژوهش حاضر جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی باکتری Bt از خاک‌های چهار زیست بوم مختلف در استان مازندران و شناسایی ژن‌های *Cry1* مؤثر روی بالپولکداران است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌های بومی باکتری Bt

نمونه ها از خاک‌های چهار زیست بوم مختلف شامل: زراعی، باغی، شهری و بدون‌پوشش از ۱۶ شهرستان استان مازندران برداشت و در مجموع ۱۲۸ نمونه خاک جمع‌آوری شد.

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی سدیم‌استات استفاده شد (Travers *et al.*, 1987). اساس این روش بر قابلیت استات سدیم برای جلوگیری از جوانه‌زنی اسپورهای Bt استوار است. در صورت کشت نمونه در محیط کشت حاوی استات سدیم تمامی اسپورها به‌جز اسپورهای Bt جوانه می‌زنند. پس از آن با شوک حرارتی اسپورهای جوانه‌زده از بین برده شده و اسپورهای مقاوم و جوانه‌نزده Bt سالم باقی می‌مانند. در ادامه محلول حاوی این اسپورها در محیط فاقد استات سدیم کشت داده می‌شوند. برای انجام مراحل ذکر شده یک گرم از نمونه به مدت سه ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB محتوی استات‌سدیم ۰/۲۵ مولار (pH: ۶/۸) کشت داده‌شد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت داده‌شده تحت تأثیر شوک حرارتی ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه‌زده سایر باکتری‌ها ازبین‌رفته و تنها اسپورهای مقاوم و جوانه‌نزده‌ی Bt باقی می‌مانند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt (LBA، T3 و CCY) کشت داده‌شدند (جدول ۱). پس از گذشت سه الی پنج

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

روز از کشت، کلنی‌های باکتری براساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و در داخل آب نمک ۰/۹ درصد در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی میکروسکوپی

سویه‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت ال.بی.اِ تک کلون شدند. پس از گذشت سه الی پنج روز از کشت، با استفاده از شیوهٔ رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو (Coomassie blue) از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و براساس شاخص‌های میکروسکوپی Bt (تولید اسپور، کلاهک (Cap) و کریستال) شناسایی شدند. شناسایی میکروسکوپی سویه‌های Bt به طور عمومی از طریق فاز کنتراست (Contrast phase) میکروسکوپ نوری (Nikon، مدل Eclipse E600) برای تشخیص کریستال‌ها (به‌رنگ تیره) و اسپورها (در فاز روشن) انجام می‌شود (Kaur, 2006).

جداسازی دی.ان. .اِی باکتری

باکتری‌های جداسازی شده روی محیط کشت ال.بی.اِ تکثیر شدند. مقداری از نمونه کشت شده داخل یک میلی‌لیتر از محلول یک حاوی Tris (۰/۰۱ مولار با pH: ۸)، EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (۰/۰۰۱ مولار) و NaCl (۱ مولار) قرار گرفت و سانتریوفوژ شد. سپس به پلت (Pellet) ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (Tris (۰/۰۲۵ مولار با pH: ۸)،EDTA (۰/۰۱ مولار)، ساکارز ۲۵ درصد و لایزوزایم (Lysozyme) (چهار میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به‌مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دو حاوی NaOH (۱۰ مولار به‌میزان دو میلی‌لیتر)، SDS (Sodium dodecyl sulfate) (۱۰ درصد به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر) و آب مقطر استریل (۸۸ میلی‌لیتر) به‌آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از NaCl (پنج مولار) به‌آن‌اضافه و به‌مدت ۴۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد باقی‌ماند. سپس نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به‌مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریوفوژ شد. محلول‌رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد و به مقدار ۲/۵-۱/۵ برابر محلول برداشته شده به آن اتانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه و سانتریفوژ شد. پلت با اتانول ۷۰ درصد دو بار شست و شو شد و پس از خشک کردن آن، در محلول TE (محتوی Tris به غلظت ۱۰ میلی‌مولار و EDTA به غلظت یک میلی‌مولار) حل شد(Rolle *et al*., 2005).

ردیابی مولکولی ژن *Cry1* و زیرگروه‌های آن

در این پژوهش ژن *Cry1* و ۱۴ زیرگروه آن (*Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*، *Cry1F*، *Cry1G*، *Cry1H*، *Cry1I*، *Cry1J* و *Cry1K*) با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر (ساخت شرکت BIONEER، کره جنوبی) (Seifinejad *et al*., 2008) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction (PCR) بهینه شده برای ژن‌های *Cry1* در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر از دی.ان.اِ، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP (غلظت نهایی: ۰/۲ میلی‌مولار)، ۰/۲ میلی‌مولار آنزیم Taq DNA Polymerase (مقدار نهایی: یک واحد)، دو میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها (غلظت نهایی ۰/۸ میکرومولار)، یک میکرولیتر از $MgCl_2$ (غلظت نهایی: دو میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی.سی.آر (مقدار نهایی X ۱) و ۱۴/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مراحل واکنش به‌ترتیب شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، پیوند به‌مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۴۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله طولانی شدن به‌مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و طویل شدن نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

پس از انجام پی.سی.آر، محصول واکنش با استفاده از ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شد و الگوهای باندی به‌دست آمده مشاهده و ثبت شد.

نتایج و بحث

با استفاده از شیوه انتخابی استات‌سدیم و براساس شکل ظاهری کلنی Bt (کلنی‌های سفید مات) از ۱۲۸ نمونه خاک زراعی، باغی، شهری و بدون‌پوشش تعداد ۴۹۱ جدایه گزینش و سپس با استفاده از شیوه‌ی رنگ‌آمیزی کوماسی بلو و براساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) شناسایی شدند (شکل ۱). بر این اساس، در این مرحله ۲۹۳

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

باکتری تولیدکننده‌ی اسپور، ۸۵ باکتری تولیدکننده‌ی اسپور و Cap و ۱۱۳ باکتری تولیدکننده‌ی اسپور، Cap و کریستال (در اصطلاح باکتری‌های تولیدکننده‌ی کریستال) شناسایی میکروسکوپی شدند که به‌ترتیب ۵۹/۶۷، ۱۷/۳۱ و ۲۳/۰۱ درصد از کل سویه‌های جداسازی شده را تشکیل می‌دهند. همچنین با بررسی موارد ذکر شده در بین چهار پوشش گیاهی، خاک‌های باغی با ۲۹/۱۳ درصد دارای بیشترین درصد سویه‌های تولیدکننده پروتئین‌های کریستال بودند (جدول۳).

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده محیط‌های کشت باکتری *Bacillus thuringiensis*

Table 1- The components of media for culture of *Bacillus thuringiensis*

محیط کشت	اجزای محیط کشت
مایع LB	تریپتون (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، NaCl (۵ گرم)، استات سدیم (۳٤ گرم) (pH ٦/٨) بر لیتر
LBA	تریپتون (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، NaCl (۵ گرم)، آگار (۱۵ گرم) بر لیتر
T3	تریپتون (۳ گرم)، تریپتوز (۲ گرم)، عصاره مخمر (۱/۵ گرم)، فسفات‌سدیم (٦ گرم) (pH ٦/٨)، MnCl (۰/۰۰۵ گرم)، آگار (۱۵ گرم) بر لیتر
CCY	LBA + ۱ ml/L از محلول نمکی (HCl (۰/۰۱ M)، ZnCl (۰/۰۵ M)، MgCl (۰/۵ M)، MnCl (۰/۱ M)، CaCl (۰/۲ M)، FeCl (۰/۰۵ M))

جدول ۲- ویژگی‌های آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای تکثیر ژن *Cry1* و زیر مجموعه‌های آن در باکتری *Bacillus thuringiensis*

Table 2- Characteristics of general and specific primers for amplification of *cry1* and its subset genes in *Bacillus thuringiensis*[*]

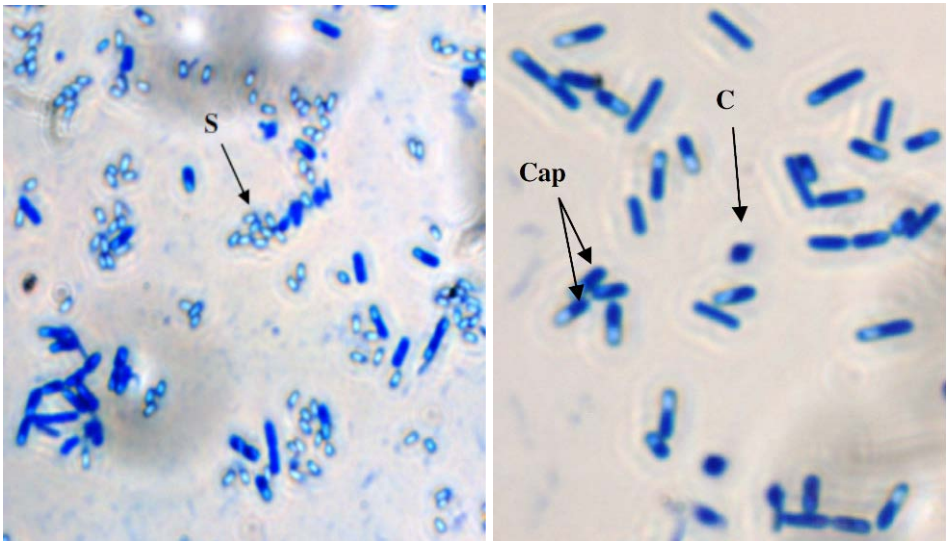
آغازگر	توالی**	موقعیت در توالی	ژن	اندازه‌ی محصول ((Base pair)bp)	شماره دسترسی بانک ژن
Cry1(F)	5′-tracrhtddbdgtattagat-3′	726	*Cry1*	1500-1600	
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′	2268			
Cry1Aa(F)	5′-ttccctttatttgggaatgc-3′	1023	*Cry1Aa*	1268	M11250
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′	2268			
Cry1Ab(F)	5′- cggatgctcatagaggagaa-3′	940	*Cry1Ab*	1371	M13898
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1Ac(F)	5′- ggaaactttcttttaatgg-3′	1452	*Cry1Ac*	844	M11068
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1Ad(F)	5′ -acccgtactgatctcaacta-3′	1057	*Cry1Ad*	1212	M73250
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1B(F)	5′- ggctaccaatacttctatta-3′	1063	*Cry1B*	1323	X06711
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1C(F)	5′-atttaatttacgtggtgttg-3′	1160	*Cry1C*	1176	X07518
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1D(F)	5′-caggccttgacaattcaaat-3′	1126	*Cry1D*	1138	X54160
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1E(F)	5′-tagggataaatgtagtacag-3′	1155	*Cry1E*	1137	X53985
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1F(F)	5′- gatttcaggaagtgattcat-3′	1302	*Cry1F*	967	M63897
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1G(F)	5′-ggttctcaaagatccgtgta-3′	1300	*Cry1G*	1128	Z22510
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1H(F)	5′-actcttttcacaccaataac-3′	1696	*Cry1H*	572	Z22513
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1I(F)	5′-acaatttacagcttattaag-3′	1027	*Cry1I*	1000	X62821
Cry1I(R)	5′-ctacatgttacgctcaatat-3′	2141			
Cry1J(F)	5′-gcgcttaataatatttcacc-3′	1162	*Cry1J*	1106	L32019
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				
Cry1K(F)	5′- tgatatgatatttcgtaacc-3′	1245	*Cry1K*	1043	U28801
Cry1(R)	5′-mdatytctakrtcttgacta-3′				

[*] برگرفته از (Seifinejad *et al*, 2008)

[**] IUB codes: b= g+t+c, d= g+a+t, k= g+t, m= a+c, r= a+g, y= c+t

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]



شکل ۱- کریستال (*c*)، اسپور (*s*) و کلاهک (*cap*) سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* (بزرگنمایی × ۱۰۰)

Figure1. Crystal (c), spore (s) and cap of native isolates of *Bacillus thuringiensis* (× 1000)

جدول ۳- توزیع سویه‌های تولیدکننده‌ی اسپور، کلاهک و کریستال باکتری *Bacillus thuringiensis* در اکوسیستم‌های مختلف

Table 3- Distribution of spore, cap and crystal forming isolates in different ecosystems

انواع اکوسیستم	تعداد کل سویه‌ها	تعداد سویه‌های تولیدکننده اسپور	تعداد سویه‌های تولیدکننده اسپور و Cap	تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال	درصد سویه‌های تولیدکننده کریستال نسبت به تعداد کل سویه‌های هر اکوسیستم
باغ	127	70	20	37	29.13
شهری	146	83	28	35	23.97
زراعی	122	78	20	24	19.67
بدون پوشش	96	62	17	17	17.7

شناسایی سویه‌های *B. thuringiensis* دارای ژن *Cry1*

برای کاهش خطای شناسایی میکروسکوپی و اطمینان بیشتر، هم دی.ان.اِ سویه‌های تولیدکننده کریستال (۱۱۳ سویه) و هم سویه‌های تولیدکننده اسپور و کلاهک (۸۵ سویه) استخراج و برای انجام آزمایش‌های بعدی آماده شد. پس از بهینه‌سازی و انجام مراحل استخراج دی.ان.اِ، این جدایه‌ها با استفاده از آغازگر *Cry1* تحت انجام واکنش پی.سی.آر قرارگرفتند. از بین آن‌ها ۱۵ سویه حاوی ژن *Cry1* در اندازه‌های مورد انتظار (۱۶۰۰-۱۵۰۰ جفت باز) بودند و پنج سویه دیگر نیز قطعات کوچکتر از انتظار (۶۰۰-۵۰۰ جفت باز) تولید کردند که نیازمند توالی‌یابی و بررسی‌های بیشتر است.

با بررسی چگونگی پراکنش این ۱۵ سویه در زیست بوم‌های مختلف، خاک‌های مناطق زراعی و شهری هرکدام دارای پنج سویه (۳۳/۳۳ درصد) دارای ژن *Cry1* و خاک‌های باغی و بدون‌پوشش به‌ترتیب دارای سه (۲۰ درصد) و دو سویه (۱۳/۳۳ درصد) دارای ژن *Cry1* بودند.

بررسی زیرگروه‌های ژن *Cry1*

پتانسیل سمیت سویه‌های Bt به نوع و زیرگروه‌های ژن *Cry* آن وابسته است (Apaydin *et al.*, 2008). در (جدول چهار) زیرگروه‌های ژن *Cry1* در این ۱۵ سویه براساس الگوهای باندی به‌دست‌آمده ارایه شده‌است.

در این بررسی، ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها یافت شدند اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. در برخی از سویه‌ها ژن‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

Cry1D، *Cry1E* و *Cry1J* در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. این سویه‌ها ممکن است محتوی یک ژن جدید یا ژن‌هایی باشند که برای کنترل بیولوژیک حشره‌ها و مدیریت مقاومت امیدبخش باشند. در برآورد فراوانی هر یک از ژن‌ها (شکل ۲) تکثیر مثبت بدون لحاظ اندازه قطعه، مبنا قرار گرفت.

نیمرخ‌های (Profile) مختلف ژن *Cry1*

آگاهی از نیمرخ‌های ژنی مختلف در باکتری Bt می‌تواند احتمال به‌کارگیری آن‌ها را در برابر طیف وسیعی از حشره‌های آفت افزایش داده و باعث کارآیی بیشتر برنامه‌های مبتنی بر کاربرد Bt شود. نتایج نشان داد که این ۱۵ سویه دارای هفت نوع نیمرخ ژنی متفاوت هستند. فراوان‌ترین نوع توالی ژنی *Cry1* در این سویه‌ها محتوی ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1D* و *Cry1I* و همچنین *Cry1Ac*، *Cry1Ad* و *Cry1I* است که هرکدام در پنج سویه (۳۳/۳۳ درصد) دیده شد (جدول ۵). همچنین متنوع‌ترین توالی ژنی در سویه AG-NH1 (٦/٦٦ درصد) که محتوی هشت ژن *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1H* و *Cry1I* مشاهده شد.

تنوع نیمرخ‌های ژنی در زیست بوم‌های مختلف

با بررسی پنج سویه‌ی دارای ژن *Cry1* متعلق به خاک‌های زراعی سه نوع نیمرخ ژنی متفاوت از یکدیگر به‌دست آمد. همچنین ژن‌های *Cry1Ac* (پنج سویه)، *Cry1Ad* (پنج سویه)، *Cry1D* (پنج سویه)، *Cry1I* (پنج سویه) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1B* (دو سویه)، *Cry1Ab* (یک سویه)، *Cry1C* (یک سویه)، *Cry1E* (یک سویه) و *Cry1H* (یک سویه) کم‌ترین فراوانی را در این زیست بوم نشان دادند. ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G*، *Cry1J* و *Cry1K* نیز در هیچ یک از سویه‌های این زیست بوم مشاهده نشد (جدول چهار).

در زیست بوم شهری نیز همانند زیست بوم زراعی از پنج سویه دارای ژن *Cry1*، سه نوع نیمرخ ژنی مختلف نسبت به یکدیگر شناسایی شد. اما تعداد ژن‌های مختلف *Cry1* در خاک این زیست بوم نسبت به خاک زیست بوم زراعی تنوع کمتری را نشان داد. برای مثال، ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1E*، *Cry1F*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* در هیچ یک از سویه‌های این زیست بوم مشاهده نشدند و تنها ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1Ad* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها و ژن‌های *Cry1D* و *Cry1J* به‌ترتیب در سه و یک سویه از این زیست بوم مشاهده شدند (جدول ٤). سویه UR-AM3 *با* پنج ژن *Cry1* مختلف، متنوع‌ترین نیمرخ ژنی این زیست بوم بود.

از سه سویه‌ی متعلق به زیست بوم باغ دو نوع نیمرخ ژنی مختلف نسبت به یکدیگر شناسایی شد (جدول ٤). در سویه‌های این زیست بوم تنها چهار ژن مختلف مشاهده شد (*Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1D* و *Cry1I*) (شکل ۳).

در زیست بوم بدون‌پوشش نیز که تنها دارای دو سویه‌ی دارای ژن *Cry1* بود، هر دو نوع سویه نیمرخ ژنی متفاوتی از یکدیگر داشتند (جدول چهار). در این زیست بوم پنج ژن مختلف مشاهده شد (*Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1B*، *Cry1D* و *Cry1I*) (شکل ٤). روی هم رفته تمامی ژن‌های متعلق به سویه‌های این زیست بوم‌ها را می‌توان در سه گروه اصلی جای داد. ۱- ژن‌هایی که با بیشترین فراوانی و در تمامی زیست بوم‌ها یافت می‌شوند. این ژن‌ها شامل: *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1D* و *Cry1I*. ۲- ژن‌هایی که تنها در یک یا دو زیست بوم مشاهده شدند. بدین ترتیب که ژن‌های *Cry1Ab*، *Cry1C*، *Cry1E* و *Cry1H* تنها در زیست بوم زراعی و ژن *Cry1J* تنها در زیست بوم شهری و ژن *Cry1B* نیز تنها در زیست بوم‌های زراعی و بدون‌پوشش مشاهده شدند. ۳- ژن‌هایی که در هیچ یک از زیست بوم‌ها یافت نشد، شامل: *Cry1Aa*، *Cry1F*، *Cry1G* و *Cry1K* (شکل۵).

در این پژوهش ٤٩١ سویه باکتری باسیلی شکل از خاک‌های چهار نوع زیست بوم مختلف جداسازی شد که ۲۳ درصد (۱۱۳ سویه) آن‌ها تولید پروتئین‌های کریستال می‌کردند.

امروزه در سراسر جهان مجموعه‌های بزرگی از سویه‌های Bt نگهداری می‌شود. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt نشان داد که ۲۰ تا ۹٦ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به‌صورت تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده‌ی کریستال بودند (Travers *et al.*, 1987). در پژوهشی دیگر برای جداسازی باکتری Bt، از ۵۳۰ نمونه از خاک‌های مناطق مختلف در کره جنوبی ۵۸ سویه Bt جداسازی کردند (Kim *et al.*, 1998b).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

جدول ٤- ویژگی‌های *Cry1* و ژن‌های مربوط به آن در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* ردیابی شده در خاک‌های استان مازندران

Table 4- Characterization of *Cry1* and its related genes in the detected Bt isolates of Mazandaran province soil samples

ردیف	نام سویه	*Cry1Aa*	*Cry1Ab*	*Cry1Ac*	*Cry1Ad*	*Cry1B*	*Cry1C*	*Cry1D*	*Cry1E*	*Cry1F*	*Cry1G*	*Cry1H*	*Cry1I*	*Cry1J*	*Cry1K*
١	**AG-JR1	*–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
٢	AG-JR2	–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
٣	AG-BS1	–	–	+	+	+	–	±	±	–	–	–	+	–	–
٤	AG-NK1	–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
٥	AG-NH1	–	+	+	+	+	+	±	–	–	–	+	+	–	–
٦	UR-AM1	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
٧	UR-AM2	–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
٨	UR-AM3	–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	±	–
٩	UR-BB1	–	–	+	+	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
١٠	UR-GH1	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
١١	GD-BS1	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
١٢	GD-BS2	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
١٣	GD-RS1	–	–	+	–	–	–	±	–	–	–	–	+	–	–
١٤	NV-MA1	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
١٥	NV-FK1	–	–	+	–	+	–	±	–	–	–	–	+	–	–

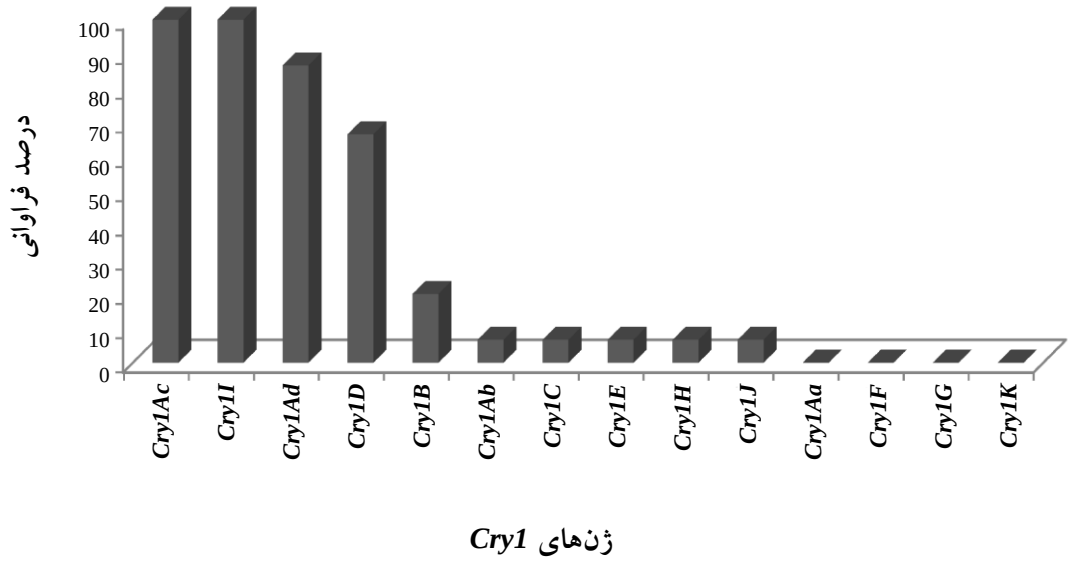
*علایم –، + و ± به‌ترتیب به معنی: بدون تکثیر، تکثیر ژن در اندازه مورد انتظار و تکثیر ژن در اندازه غیرقابل انتظار

**علایم AG: خاک‌های زراعی، UR: شهری، GD: باغی، NV: بدون پوشش، JR: شهرستان جویبار، BS: بابلسر، NK: نکا، NH: نوشهر، AM: آمل، BB: بابل، GH: قائم‌شهر، RS: رامسر، MA: محمودآباد و FK: فریدون‌کنار

*The marks, -, + and ± mean: no amplification, amplifying the expected fragment and amplifying unexpected fragment, respectively.

**The Isolates: AG: Crop, UR: Urban, GD: Orchard and NV: Non-Vegetation soils

JR: Juybar, BS: Babolsar, NK: Neka, NH: Nowshahr, AM: Amol, BB: Babol, GH: Ghaemshahr, RS: Ramsar, MA: Mahmoud abad, FK: Fereydunkenar



شکل ۲- فراوانی انواع ژن‌های *Cry1* در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* به‌دست امده از نمونه‌های خاک

Figure 2- *Cry1* genes abundance in detected *Bacillus thuringiensis* isolates of soil samples

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

در تونس، در میان ۷٤ سویه باسیلوس جدا شده از خاک‌های مختلف ۲۰ سویه Bt جداسازی شد (Cherif *et al.*, 2001). در جنوب ایالات متحده مرکزی از ٤۱۳ نمونه خاک و گرد و خاک انبار حبوبات، ۲۵ سویه Bt به‌دست آمد که ۲۱ سویه آن از خاک جداسازی شده بود (Ejiofor & Johnson, 2002).

در پژوهشی در ایران از ۲۲۹۲ نمونه‌ی خاکی از مزارع ۲۸ استان مختلف ایران، ۲۸٤٤۵ کلنی باسیلی شکل جدا کردند که از بین آن‌ها ۱۲۸ سویه، تولید کریستال می‌کردند (Salehi Jouzani *et al.*, 2008). تمامی نتایج نشان دهنده آن است که در پژوهش‌های انجام شده برای ردیابی این باکتری دستاوردهای متغییری داشته است. نتیجه مشترک بیشتر پژوهش‌ها، فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی مناطق مختلف است که این مطلب در پژوهش حاضر نیز تایید شد. براساس نتایج مولکولی به‌دست آمده در پژوهش حاضر از ۱۵ سویه دارای ژن *Cry1* ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1I*، *Cry1Ad* و *Cry1D* دارای بیشترین فراوانی و سایر ژن‌ها با فراوانی کمتری مشاهده شدند (شکل ۲).

در پژوهشی از ۱٦۳ سویه Bt جداسازی شده از انبار غلات ژن *Cry1Ab* (٤۷ درصد) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1G* (دو درصد) و *Cry1E* (یک درصد) دارای کم‌ترین فراوانی بودند (Kim *et al.*, 1998a). همین پژوهشگران در پژوهش دیگری از ۵۸ سویه Bt جداسازی شده از خاک، ژن‌های *Cry1C* (۵۷ درصد) و *Cry1Ab* (٤۵ درصد) فراوان‌ترین ژن‌ها بودند و ژن‌های *Cry1E* و *Cry1F* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند (Kim *et al.*, 1998b). در عربستان صعودی نیز سویه‌های باکتری Bt از خاک و اجساد لاروهای *Spodoptera littoralis* از استان مکه جداسازی شدند. در این غربالگری بر مبنای شیوه‌های مورفولوژیک و مولکولی هشت سویه Bt یافت شد که تمامی آن‌ها دارای ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry4A* و *Cry4B* و سه سویه از آن‌ها دارای ژن‌های *Vip3A* بودند که نشان دهنده قابلیت احتمالی مؤثر بودن آن‌ها روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان بود (Abulreesh *et al.*, 2012). در کشور سوریه از ٤۰ سویه Bt جداسازی شده از لاروهای آلوده، در تمامی سویه‌ها ژن‌های *Cry1Aa* و *Cry1Ac* مشاهده شدند. پس از آن ژن‌های *Cry1I* (۳۷ سویه) و *Cry1Ab* (۳٤ سویه) با بیشترین فراوانی و ژن *Cry1D* (چهار سویه) با کم‌ترین فراوانی مشاهده شد (Ammouneh *et al.*, 2013). در هند نیز با بررسی سویه‌های Bt مؤثر روی حشره‌های راسته‌های بالپولکداران و سخت بالپوشان، ژن *Cry1I* با بیشترین فراوانی (۷/۰۵ درصد) مشاهده شد (Pooja *et al.*, 2013). در پژوهش مشابهی در ایران از ۷۰ سویه Bt، ۳٤ سویه (٤۹ درصد) دارای ژن *Cry1* بودند. ژن *Cry1I* (۱۰۰ درصد) دارای بیشترین فراوانی بوده و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* یافت نشدند (Seifinejad *et al.*, 2008) که نتایج نزدیک‌تری با پژوهش حاضر داشت. همانگونه که از نتایج استنباط می‌شود محتویات ژنتیک بر خلاف شباهت‌های جزیی تفاوت‌های بسیاری با یکدیگر دارند. مقایسه این نتایج نشان دهنده‌ی آن است که نواحی جغرافیایی مختلف بر روی تنوع محتویات ژن *Cry* در سویه‌های باکتری Bt اثر می‌گذارد (Apaydin *et al.*, 2005). در کنار آن می‌توان به نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها اشاره کرد که در طی این فرآیند تبادل ژنتیک بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نوترکیبی با محتویات ژنتیک جدیدی می‌شود. از این رو تنوع در سویه‌های مختلف باکتری Bt و محتویات ژنوتیپی آن‌ها ممکن است به این حقیقت که بیشتر ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های آفت‌کش این باکتری روی پلازمیدهای کروموزوم اضافی قابل انتقال قرار دارد، مرتبط باشد. قرار گرفتن آن‌ها روی این پلازمید اجازه‌ی انتقالشان را طی این فرآیند بین سویه‌های سازگار می‌دهد که منجر به تولید سویه‌هایی با محتویات ژنوتیپی جدیدی از توکسین‌های مختلف می‌شود (Makhdoom, 1998). از دیگر موارد این که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده ژن *Cry1C* به طور معمولی با ژن *Cry1D* همراه بوده است و همچنین این موضوع در پژوهش (Seifinejad *et al.* ۲۰۰۸) در ایران نیز مشاهده شد. اما در این پژوهش اگرچه ۱۰ سویه دارای ژن *Cry1D* هستند ولی تنها در یک سویه با ژن *Cry1C* همراه بودند (جدول۵). بنابراین ممکن است این پیشنهاد به اندازه‌ی کافی قابل دفاع نباشد، همچنان‌که در پژوهش های دیگری نیز به این موضوع اشاره شده است (Armengol *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2005). در مقابل در پژوهش ما ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1Ad* در ۱۳ تا از ۱۵ سویه (۸٦/٦٦ درصد) همراه با هم مشاهده شده و نشان داد که این دو ژن پیوند بیشتری با یکدیگر دارند (جدول۵).

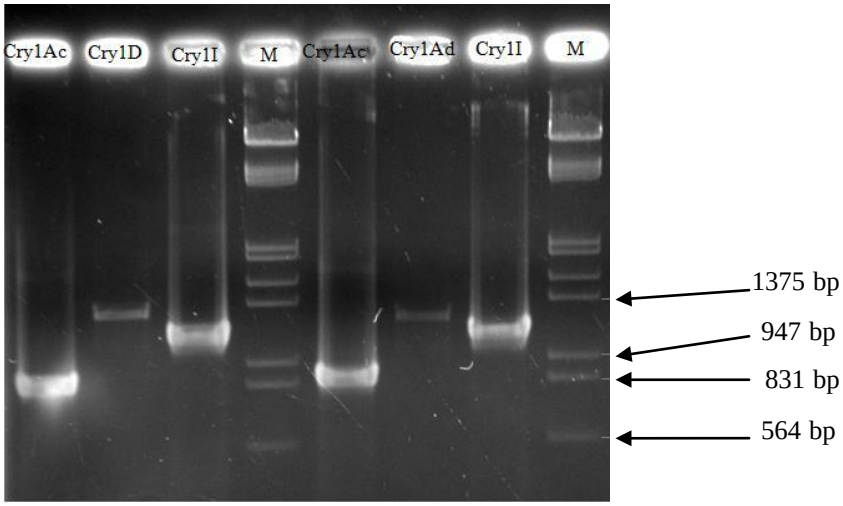
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

جدول ۵- نیمرخ ژنی *Cry1* در سویه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های استان مازندران

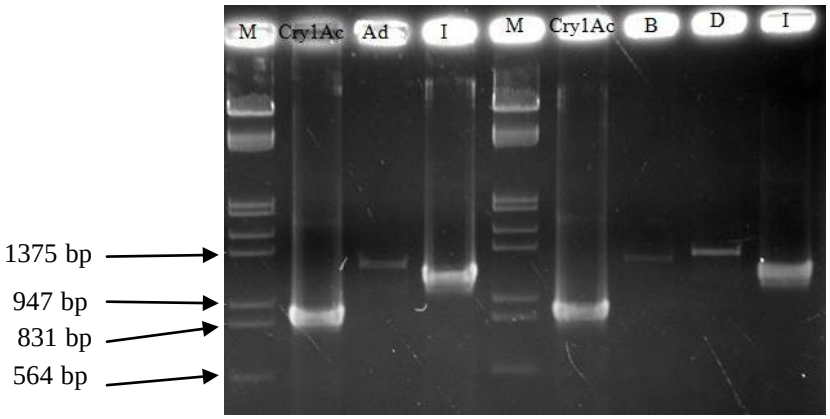
Table 5- *Cry1* gene profiles in isolated *Bacillus thuringiensis* strains from soil samples of Mazandaran province

ردیف	نیمرخ‌های ژنی	تعداد سویه	فراوانی (درصد)
1	*Cry1Ab,Cry1Ac,Cry1Ad,Cry1B,Cry1C,Cry1D,Cry1H,Cry1I*	1	6.66
2	*Cry1Ac,Cry1Ad,Cry1B,Cry1D,Cry1E,Cry1I*	1	6.66
3	*Cry1Ac,Cry1Ad,Cry1D,cry1I,Cry1J*	1	6.66
4	*Cry1Ac,Cry1Ad,Cry1D,Cry1I*	5	33.33
5	*Cry1Ac,Cry1B,Cry1D,Cry1I*	1	6.66
6	*Cry1Ac,Cry1Ad,Cry1I*	5	33.33
7	*Cry1Ac,cry1D,Cry1I*	1	6.66



شکل ۳- نیمرخ ژنی سویه‌های *GD-BS2* (سمت راست) و *GD-RS1* (سمت چپ) (*M*: نشانگر مولکولی وزنی)

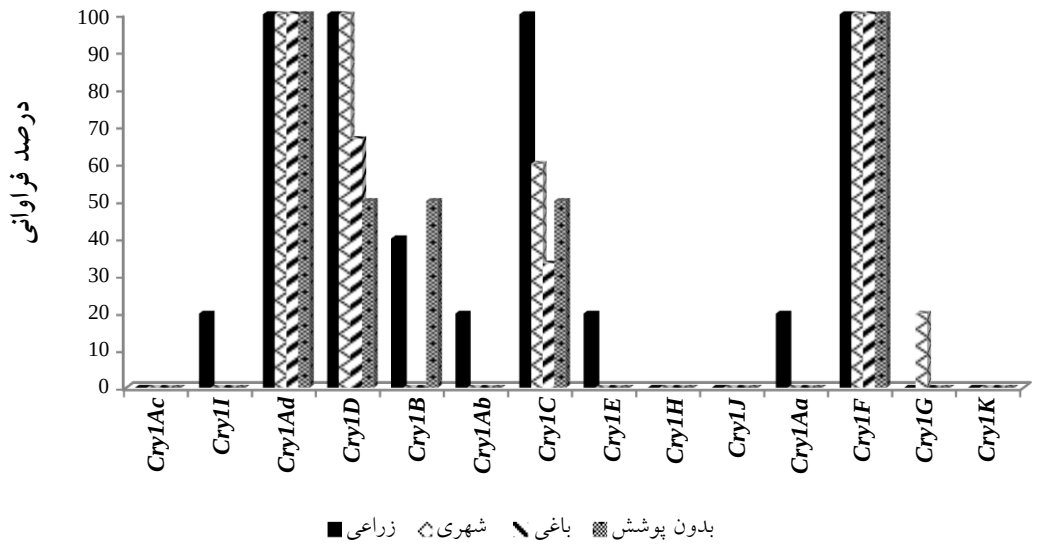
Figure 3- Gene profile of GD-BS2 (right) and GD-RS1 (left) strains (M: Molecular weight marker)



شکل ٤- نیمرخ ژنی سویه‌های NV-FK1 (سمت راست) و NV-MA1 (سمت چپ) (M: نشانگر مولکولی وزنی)

Figure 4- Gene profile of NV-FK1 (right) and NV-MA1 strains (left) (M: Molecular weight marker)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]



شکل ۵- توزیع ژن‌های *Cry1* اختصاصی بالپولکداران در اکوسیستم‌های مختلف

Figure 5- The Lepidopteran-specific active *Cry1* genes distribution in different ecosystems.

در این پژوهش براساس شاخص‌های میکروسکوپی بیشترین تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال در خاک‌های باغ (۲۹ درصد) و کم‌ترین آن در خاک‌های بدون‌پوشش گیاهی (۱۷ درصد) مشاهده شد. براساس شاخص‌های مولکولی بیشترین تعداد و تنوع از زیر گروه‌های ژنی *Cry1* در خاک‌های زراعی و کم‌ترین تعداد سویه دارای این ژن نیز همچنان در خاک‌های بدون‌پوشش مشاهده شد. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که خاک‌های باغی و زراعی به دلیل برخورداری از پوشش‌های گیاهی و در پی آن تنوع زیستی مناسب برای حشرات و میکروارگانیسم‌های خاک و در نتیجه فراوانی میزبانی بیشتر برای این باکتری، منبع مناسب‌تری برای جداسازی باکتری Bt پیشنهاد می‌شوند.

نتیجه مشترک بین مشاهده‌های میکروسکوپی و مولکولی نشان داد که خاک‌های بدون‌پوشش گیاهی نتایج رضایت‌بخشی را در رابطه با وجود این باکتری در خاک‌های این نوع از زیست بوم از خود نشان نداده است و به‌عنوان منبعی مناسب برای جداسازی این باکتری پیشنهاد نمی‌شود.

علاوه بر این وجود چندین نیمرخ ژنی در این ۱۵ سویه (بین سه تا هشت زیر مجموعه مربوط به *Cry1*) و همچنین وجود ژن‌های بومی در این سویه‌ها نشان دهنده قابلیت مناسب آن‌ها به‌عنوان یک آفت‌کش زیست بومی است. در ادامه انجام آزمایش‌های زیست سنجی با استفاده از این سویه‌ها روی یک یا چند آفت از خانواده بالپولکداران، توصیف دقیق‌تری از قابلیت کاربرد عملی آن‌ها در اختیار خواهد گذاشت که امید است پس از طی مراحل تکمیلی، در برنامه‌های کنترل میکروبی و مدیریت مقاومت آفت ها در آینده مورد استفاده قرار گیرند.

در این پژوهش ٤٩١ سویه باکتری باسیلی شکل از خاک‌های چهار نوع زیست بوم مختلف جداسازی شد که ۲۳ درصد (۱۱۳ سویه) آن‌ها تولید پروتئین‌های کریستال می‌کردند.

امروزه در سراسر جهان مجموعه‌های بزرگی از سویه‌های Bt نگهداری می‌شود. یکی از اولین پژوهش‌های انجام شده در زمینه جداسازی باکتری Bt نشان داد که ۲۰ تا ۹٦ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به‌صورت تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکننده‌ی کریستال بودند (Travers *et al.*, 1987). در پژوهشی دیگر برای جداسازی باکتری Bt، از ۵۳۰ نمونه از خاک‌های مناطق مختلف در کره جنوبی ۵۸ سویه Bt جداسازی کردند (Kim *et al.*, 1998b).

در تونس، در میان ٧٤ سویه باسیلوس جدا شده از خاک‌های مختلف ۲۰ سویه Bt جداسازی شد (Cherif *et al.*, 2001). در جنوب ایالات متحده مرکزی از ٤١٣ نمونه خاک و گرد و خاک انبار حبوبات، ۲۵ سویه Bt به‌دست آمد که ۲۱ سویه آن از خاک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

جداسازی شده بود (Ejiofor & Johnson, 2002).

در پژوهشی در ایران از ۲۲۹۲ نمونه‌ی خاکی از مزارع ۲۸ استان مختلف ایران، ۲۸٤٤٥ کلنی باسیلی‌شکل جدا کردند که از بین آن‌ها ۱۲۸ سویه، تولید کریستال می‌کردند (Salehi Jouzani *et al.*, 2008).

تمامی نتایج نشان دهنده آن است که در پژوهش‌های انجام شده برای ردیابی این باکتری دستاوردهای متغییری داشته است. نتیجه مشترک بیشتر پژوهش‌ها، فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی مناطق مختلف است که این مطلب در پژوهش حاضر نیز تایید شد.

براساس نتایج مولکولی به‌دست آمده در پژوهش حاضر از ۱۵ سویه دارای ژن *Cry1*، ژن‌های *Cry1Ac*، *Cry1I*، *Cry1Ad* و *Cry1D* دارای بیشترین فراوانی و سایر ژن‌ها با فراوانی کمتری مشاهده شدند (شکل۲).

در پژوهشی از ۱٦۳ سویه Bt جداسازی شده از انبار غلات ژن *Cry1Ab* (٤۷ درصد) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1G* (دو درصد) و *Cry1E* (یک درصد) دارای کم‌ترین فراوانی بودند (Kim *et al.*, 1998a). همین پژوهشگران در پژوهش دیگری از ۵۸ سویه Bt جداسازی شده از خاک، ژن‌های *Cry1C* (۵۷ درصد) و *Cry1Ab* (٤۵ درصد) فراوان‌ترین ژن‌ها بودند و ژن‌های *Cry1E* و *Cry1F* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند (Kim *et al.*, 1998b). در عربستان صعودی نیز سویه‌های باکتری Bt از خاک و اجساد لاروهای *Spodoptera littoralis* از استان مکه جداسازی شدند. در این غربالگری برمبنای شیوه‌های مورفولوژیک و مولکولی هشت سویه Bt یافت شد که تمامی آن‌ها دارای ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry4A* و *Cry4B* و سه سویه از آن‌ها دارای ژن‌های *Vip3A* بودند که نشان دهنده قابلیت احتمالی مؤثر بودن آن‌ها روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان بود (Abulreesh *et al.*, 2012). در کشور سوریه از ٤۰ سویه Bt جداسازی شده از لاروهای آلوده، در تمامی سویه‌ها ژن‌های *Cry1Aa* و *Cry1Ac* مشاهده شدند. پس از آن ژن‌های *Cry1I* (۳۷ سویه) و *Cry1Ab* (۳٤ سویه) با بیشترین فراوانی و ژن *Cry1D* (چهارسویه) با کم‌ترین فراوانی مشاهده شد (Ammouneh *et al.*, 2013). در هند نیز با بررسی سویه‌های Bt مؤثر روی حشرات راسته‌های بالپولکداران و سخت‌بالپوشان، ژن *Cry1I* با بیشترین فراوانی (۷/۰۵ درصد) مشاهده شد (Pooja *et al.*, 2013).

در پژوهش مشابهی در ایران از ۷۰ سویه Bt، ۳٤ سویه (٤۹ درصد) دارای ژن Cry1 بودند. ژن *Cry1I* (۱۰۰ درصد) دارای بیشترین فراوانی بوده و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* یافت نشدند (Seifinejad *et al.*, 2008) که نتایج نزدیک‌تری با پژوهش حاضر داشت.

همانگونه که از نتایج استنباط می‌شود، محتویات ژنتیک بر خلاف شباهت‌های جزیی تفاوت‌های بسیاری با یکدیگر دارند. مقایسه این نتایج نشان دهنده‌ی آن است که نواحی جغرافیایی مختلف بر روی تنوع محتویات ژن *Cry* در سویه‌های باکتری Bt اثر می‌گذارد (Apaydin *et al.*, 2005). در کنار آن می‌توان به نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها اشاره کردد که در طی این فرآیند تبادل ژنتیک بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نوترکیبی با محتویات ژنتیک جدیدی می‌شود. از این رو تنوع در سویه‌های مختلف باکتری Bt و محتویات ژنوتیپی آن‌ها ممکن است به این حقیقت که بیشتر ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های آفت‌کش این باکتری روی پلازمیدهای کروموزوم اضافی قابل انتقال قرار دارد، مرتبط باشد. قرار گرفتن آن‌ها روی این پلازمید اجازه‌ی انتقالشان را طی این فرآیند بین سویه‌های سازگار می‌دهد که منجر به تولید سویه‌هایی با محتویات ژنوتیپی جدیدی از توکسین‌های مختلف می‌شود (Makhdoom, 1998).

از موارد دیگر این است که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده ژن *Cry1C* به طور معمول با ژن *Cry1D* همراه بوده است و همچنین این موضوع در پژوهش (Seifinejad *et al.* 2008) در ایران نیز مشاهده شد. اما در این پژوهش اگرچه ده سویه دارای ژن *Cry1D* هستند ولی تنها در یک سویه با ژن *Cry1C* همراه بودند (جدول ۵). بنابراین ممکن است این پیشنهاد به اندازه‌ی کافی قابل دفاع نباشد، همچنان‌که در پژوهش های دیگری نیز به این موضوع اشاره شده است (Armengol *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2005). در مقابل در پژوهش ما ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1Ad* در ۱۳ تا از ۱۵ سویه (۸٦/٦٦ درصد) همراه با هم مشاهده شده و نشان داد که این دو ژن پیوند بیشتری با یکدیگر دارند (جدول ۵).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

در این پژوهش براساس شاخص‌های میکروسکوپی بیشترین تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال در خاک‌های باغ (۲۹ درصد) و کم‌ترین آن در خاک‌های بدون پوشش‌گیاهی (۱۷ درصد) مشاهده شد. براساس شاخص‌های مولکولی بیشترین تعداد و تنوع از زیر گروه‌های ژنی *Cry1* در خاک‌های زراعی و کم‌ترین تعداد سویه دارای این ژن نیز همچنان در خاک‌های بدون پوشش مشاهده شد.

بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که خاک‌های باغی و زراعی به دلیل برخورداری از پوشش‌های گیاهی و در پی آن تنوع زیستی مناسب برای حشره‌ها و میکروارگانیسم‌های خاک و در نتیجه فراوانی میزبانی بیشتر برای این باکتری، منبع مناسب‌تری برای جداسازی باکتری Bt پیشنهاد می‌شوند.

نتیجه مشترک بین مشاهدات میکروسکوپی و مولکولی نشان داد که خاک‌های بدون پوشش‌گیاهی نتایج رضایت‌بخشی را در رابطه با وجود این باکتری در خاک‌های این نوع از زیست بوم از خود نشان نداده است و به‌عنوان منبعی مناسب برای جداسازی این باکتری پیشنهاد نمی‌شود.

علاوه بر این وجود چندین نیمرخ ژنی در این ۱۵ سویه (بین سه تا هشت زیر مجموعه مربوط به *Cry1*) و همچنین وجود ژن‌های بومی در این سویه‌ها نشان دهنده قابلیت مناسب آن‌ها به‌عنوان یک آفت‌کش زیستی بومی است. در ادامه انجام آزمایش های زیست سنجی با استفاده از این سویه‌ها روی یک یا چند آفت از خانواده بالپولکداران، توصیف دقیق‌تری از قابلیت کاربرد عملی آن‌ها در اختیار خواهد گذاشت که امید است پس از طی مراحل تکمیلی، در برنامه‌های کنترل میکروبی و مدیریت مقاومت آفت ها در آینده مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

Abulresh, H. H, Osman, G. E. H and Assaeedi, A. S. A. 2012. Characterization of Insecticidal Genes of Bacillus thuringiensis Strains Isolated from Arid Environments. Indian Journal of Microbiology 52: 500-503.

Ammouneh, H, Ismail, H, Al-bedda, A, Abou Baker, N and Harba, M. 2013. Characterization of lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from infected larvae. Biocontrol Science and Technology 23: 607-623.

Apaydin, O, Cinar, C, Turanli, F, Harsa, S and Gunes, H. 2008. Identification and bioactivity of native strains of *Bacillus thuringiensis* from grain-related habitats in Turkey. Biological Control 45: 21-28.

Apaydin, O, Yenidunya, A. F, Harsa, S and Gunes, H. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 285-292.

Aramideh, S, Saferalizadeh, M. H, Pourmirza, A. A, Rezazadeh Bari, M, Keshavarzi, M and Mohseniazar, M. 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. African Journal of Microbiology Research 4: 1224-1229.

Armengol, G., Escobar, M. C., Maldonado, M. E. and Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against Dipteran and Lepidopteran insects. Journal of Applied Microbiology 102: 77-88.

Cherif, A, Ouzari, H, Daffonchio, D, Cherif, H, Ben Slama, K, Hassen, A, Jaoua, S and Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology 32: 243-247.

Crickmore, N, Zeigler, D. R, Feitelson, J, Schnepf, E, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.

Ejiofor, A. O and Johnson, 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.

Hofte, H and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of Bacilllus thuringiensis. Microbiological Reviews 53: 242-255.

Kaelin, P, Morel, P and Gadani, F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma sericome* (F.). Applied and Environmental Microbioligy 60: 19-25.

Kaur, S. 2006. Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 233-253.

Kim, H. S, Lee, D. W, Woo, S. D, Yu, Y. M and Kang, S. K. 1998a. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from granary in Korea. Current Microbiology 37: 52-57.

Kim, H. S, Lee, D. W, Woo, S. D, Yu, Y. M and Kang, S. K. 1998b. Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. Current

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]

Microbiology 37: 195-200.

Makhdoom, R. 1998. Cloning and sequencing of the delta endotoxin gene from locally isolated *Bacillus thuringiensis* toxic against spotted bollworm. Ph. D. Thesis, University of the Punjab, 160 p.

Martinez, C, Ibarra, J. E and Caballero, P. 2005. Association analysis between serotype, *cry* gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 91-97.

Martinez, C, Porcar, M, Lopez, A, Escudero, I. R, Perez-Liarena, F. J and Caballero, P. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against Lepidopteran insects. Entomologia Experimentalis et Applicata 111: 71-77.

Neema, P. M, Girija, D, Aparna, C and Firoz, P. M. 2010. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* from the Western Ghats of Kerala. Asian Journal of BioScience 4: 278-285.

Obeidat, M, Hassawi, D and Ghabeish, I. 2004. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller. African Journal of Biotechnology 3: 622-626.

Pooja, A. S, Krishnaraj, P. U and Prashanthi, S. K. 2013. Profile of *cry* from native *Bacillus thuringiensis* isolates and expression of *cry1I*. African Journal of Biotechnology 12: 3545-3562.

Rolle, R. L. 2004. Proteinacious and genomic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates collected in the Tennessee geographical region. Ph. D. thesis, Tennessee State University, 302 p.

Rolle, R. L, Ejiofor, A. Oand Johnson, T. L. 2005. Determination of the plasmid size and location of δ-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. African Journal of Biotechnology 4: 580-585.

Salehi Jouzani, G, Pourjan Abad, A, Seifinejad, A, Marzban, R, Kariman, K and Maleki, B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from diverent ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 83-94.

Seifinejad, A, Salehi Jouzani, G. R, Hosseinzadeh, A and Abdmishani, C. 2008. Charactrization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological Control 44: 216-226.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.1.5.6]