

شناسایی ساختار ژنی سویه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های مناطق جنگلی استان مازندران

Genetic Characterization of Native *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Forst Soil Samples of Mazandaran Province

فاطمه گرایلی‌مرادی^۱، محمود محمدی‌شریف^{۲*}، علیرضا هادی‌زاده^۳ و ولی‌الله بابائی‌زاد^۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۱۵

چکیده

سویه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* (Bt) از خاک‌های جنگلی مناطق مختلف استان مازندران جداسازی و ژن *Cry1* عامل تولید پروتئین موثر روی حشرات، در آنها ردیابی شد. از ۳۲ نمونه خاک مورد بررسی از طریق بازدارندگی انتخابی استات‌سدیم، ۱۴۴ سویه‌ی باسیلوس جداسازی گردید. پس از کشت کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی اختصاصی و شناسایی میکروسکوپی در ۳۲/۶۳٪ از سویه‌ها پروتئین‌های کریستالی مشاهده شد که برای بسیاری از حشرات سمی هستند. بررسی جدایه‌های Bt نشان داد که در هفت جدایه، ژن *Cry1* وجود دارد. آزمایش‌های تعیین ساختار ژنی برای وجود چهار ژن *Cry1A* (شامل *Aa*، *Ab*، *Ac* و *Ad*) و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*، *Cry1F*، *Cry1G*، *Cry1H*، *Cry1I*، *Cry1J* و *Cry1K* با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها مشاهده شد، ولی ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1E* و *Cry1G* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند. نتایج این پژوهش نشان داد که از این شیوه‌های مولکولی می‌توان برای ردیابی سویه‌های بومی باکتری Bt که دارای پروتئین‌های موثر روی حشرات هستند، استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین کریستالی، ژن *Cry1*، شناسایی مولکولی Bt

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد حشره‌شناسی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲، ۳ و ۴. استادیاران حشره‌شناسی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

Email: msharif1353@yahoo.com

*: نویسنده مسوول

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) یک باکتری گرم مثبت و اسپورزاست که اغلب به‌عنوان یک حشره‌کش زیستی- میکروبی در سطح وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد (آپادین و همکاران (Apaydin et al., 2008)). باکتری Bt در طی فرآیند اسپورزایی، پروتئین کریستالی تولید می‌کند که دلتا- اندوتوکسین نام داشته و قابلیت حشره‌کشی زیادی روی لاروهای حشرات راسته‌های بالپولکداران، سخت‌بالپوشان و دوبالان دارد شوکا و همکاران (Sauka et al., 2006). دو نوع دلتا-اندوتوکسین به‌صورت پروتئین‌های کریستالی (Cry) اختصاصی و پروتئین‌های سیتولیتیک (Cyt) غیراختصاصی وجود دارد مارتینز و همکاران (Martinez et al., 2004). در سال ۱۹۸۹، چهار دسته از ژن‌های Cry و دو دسته از ژن‌های Cyt توصیف شدند هافت و ویتلی (Hofte and Whiteley, 1989). ژن‌های Cry1 پروتئین‌هایی را رمزگردانی می‌کنند که روی راسته‌ی بالپولکداران سمیت دارند؛ ژن‌های Cry2 روی راسته‌های بالپولکداران و دوبالان؛ ژن‌های Cry3 روی راسته‌ی سخت‌بالپوشان؛ و ژن‌های Cry4 روی راسته‌ی دوبالان فعالیت دارند کالین و همکاران، کریک‌مور و همکاران (Kaelin et al., 1994; Crickmore et al., 1998).

حشره‌کش‌های زیستی با پایه Bt در سراسر جهان برای کنترل انواع لاروهای که از آفات مهم اقتصادی هستند، به‌کار می‌روند بورا و همکاران (Bora et al., 1994). زمانی که لارو یک حشره حساس، مخلوط کریستال- اسپور باکتری Bt را می‌بلعد، کریستال در محیط قلیایی معده‌ی میانی حشره حل‌شده و سپس این پیش‌توکسین‌ها از طریق پروتئازهای معده‌ی میانی به پپتیدهای سمی فعال تبدیل می‌شوند. توکسین فعال به گیرنده‌های روی سطح سلول‌های معده‌ی میانی متصل شده و با ایجاد منافذی در غشاء سلول، عملکرد بخش میانی دستگاه گوارش را مختل و باعث مرگ حشره می‌شوند گوگ و همکاران (Gough et al., 2005).

امروزه باکتری Bt از منابع مختلف در سراسر جهان یافت و گزارش شده است. ازجمله می‌توان به جداسازی این باکتری از لاشه سوسک‌های توتون و بقایای گیاهی توتون در کشورهای مختلف کالین و همکاران (Kaelin et al., 1994)، نمونه‌های خاکی در کره‌جنوبی کیم و همکاران (Kim et al., 1998b)، محصولات انباری از کره‌جنوبی کیم و همکاران (Kim et al., 1998a) و چین هانگ‌یو و همکاران (Hongyu et al., 2000)، زیستگاه‌های آبی و خاکی در اسپانیا مارتینز و کابالرو (Martinez and Caballero, 2002)، زیستگاه‌های حبوبات در

ترکیه آپادین و همکاران (2005)، لجن فاضلاب در کانادا محمدی و همکاران (Mohammedi et al., 2006)، باغات زیتون در ترکیه سینار و همکاران (Cinar et al., 2008) و لاشه آفات پنبه در ایران خوجند و همکاران (Khojand et al., 2013) اشاره نمود. اگرچه باکتری Bt از منابع مختلفی جداسازی شده است، اما نمونه‌های خاکی فراوان‌ترین و متنوع-ترین منبع Bt هستند آرمیده و همکاران (Aramideh et al., 2010).

شناسایی ژن‌های Cry باکتری Bt با شیوه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ توصیف شد کاروزی و همکاران (Carozzi et al., 1991). شناسایی ژن‌های سمی Bt از طریق PCR می‌تواند در پیش‌بینی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های شناسایی شده کمک کند. این روش‌ها، سریع، موثر و مطمئن بوده و جانشین مناسبی برای روش‌های سنتی مبتنی بر زیست‌سنجی هستند. همچنین در شیوه‌های مولکولی با ساخت آغازگرهای جدید می‌توان از آنها برای شناسایی ژن‌های Cry جدید و سایر ژن‌های تولیدکننده‌ی توکسین استفاده نمود پارکر و خوآرز-پرز (Porcar and Juarez-Perez, 2003). تا به امروز، بیش از ۳۵۰ ژن Cry توالی‌یابی‌شده که گروه‌های اصلی Cry1 تا Cry51 را شامل می‌شود. در این میان، گروه‌های Cry1، Cry2 و Cry9 بیشترین کارایی را برای کنترل گونه‌های بالپولکداران داشته‌اند. ژن‌های Cry1 فراوان‌ترین ژن‌های Cry در طبیعت بوده و بیش از ۴۳٪ از توالی‌های Cry شناخته شده متعلق به این گروه است روزاز-گارسیا و همکاران (Rosas-Garcia et al., 2008).

هدف پژوهش حاضر جداسازی و غربال‌گری سویه‌های بومی Bt از خاک‌های اکوسیستم‌های جنگلی شهرستان‌های استان مازندران و همچنین کاربرد شیوه‌های مولکولی برای بررسی وجود ژن Cry1 (عامل تولید توکسین مؤثر روی حشرات آفت راسته‌ی بالپولکداران) بود. علاوه بر این با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای زیرگروه‌های ژن Cry1، ژنوتیپ سویه‌های دارای این ژن تعیین و بر این اساس قابلیت احتمالی حشره-کشی آنها نیز پیش‌بینی می‌شود. بدین ترتیب امید است با معرفی سویه‌های بومی جدید، پس از مراحل تکمیلی از آنها برای تولید حشره‌کش‌های زیستی- میکروبی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات و کنترل بیولوژیک حشرات آفت استفاده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای نمونه‌برداری خاک‌هایی از عمق ۵-۲ سانتی‌متری برداشت شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در داخل کیسه‌های پلاستیکی استریل ذخیره و به آزمایشگاه حمل گردید. این نمونه‌ها از خاک‌های جنگلی مناطق مختلف استان مازندران

شامل ۱۶ شهرستان بهشهر، نکا، ساری، جویبار، قائمشهر، سوادکوه، بابل، بابلسر، محمودآباد، فریدون‌کنار، آمل، نور، نوشهر، چالوس، تنکابن و رامسر جمع‌آوری شد (شکل ۱). از هر شهرستان دو نمونه و در مجموع ۳۲ نمونه‌ی خاک برای جداسازی باکتری Bt برداشت گردید.



شکل ۱: مکان‌های نمونه‌برداری از خاک‌های جنگلی استان مازندران (هر شهرستان به تفکیک با پیکان نشان داده شده است)

Fig. 1: Sampling locations from the forest soil samples of Mazandaran province (each county is separately showed by an arrow)

کشت باکتری و شناسایی میکروسکوپی

سویه‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت LBA تک‌کلون شدند. پس از گذشت ۵-۳ روز از کشت، با استفاده از شیوه‌ی رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و براساس شاخص‌های میکروسکوپی Bt (تولید اسپور، کلاهک (Cap) و کریستال) شناسایی انجام شد.

استخراج DNA باکتری

باکتری‌های جداسازی شده روی محیط کشت LBA تکثیر شدند. مقداری از نمونه کشت شده داخل یک میلی‌لیتر از محلول ۱ حاوی Tris (۰/۰۱ M, PH=۸), EDTA (۰/۰۱ M) و NaCl (۱ M) قرار گرفت و سانتریفوژ شد. سپس به پلت ۲۰۰ μl از بافر استخراج Tris (۰/۰۲۵ M, PH=۸), EDTA (۰/۰۱ M) ساکارز ۲۵٪ و لایوزایم (۴ mg/ml) اضافه شد و بمدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷°C قرار گرفت. سپس ۱۰۰ μl از محلول ۲ حاوی NaOH (۱۰ M) به‌میزان ۲ میلی-

جداسازی اختصاصی باکتری Bt

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی استات‌سدیم استفاده شد. بدین‌طریق که یک گرم از نمونه به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰°C در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع محتوی استات‌سدیم ۰/۲۵ M (PH=۶/۸) کشت داده شد. استات‌سدیم به‌طور اختصاصی مانع جوانه‌زنی اسپورهای Bt می‌شود. یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت داده شده به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت شوک حرارتی ۶۰ تا ۷۰°C قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه زده سایر باکتری‌ها از بین رفته و تنها اسپورهای مقاوم و جوانه نزده‌ی Bt باقی می‌ماندند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt (LBA, T₃ و CCY) کشت داده شدند. پس از گذشت ۵-۳ روز از کشت، کلنی‌های باکتری براساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و در داخل آب نمک ۰/۹٪ در دمای ۴۰°C نگهداری شدند تر/ورز و همکاران (Travers et al., 1987).

طراحی آغازگر

بر مبنای توالی‌های ژنی ارائه شده برای ژن‌های اختصاصی *Cry1*، در بانک‌های اطلاعاتی مهم آغازگرهای مختلفی سنتز شدند.

در این پژوهش ژن *Cry1* و ۱۴ زیرمجموعه‌ی آن (*Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*، *Cry1F*، *Cry1G*، *Cry1H*، *Cry1I*، *Cry1J* و *Cry1K*) با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر سیفی‌نژاد و همکاران (Seifinejad et al., 2008) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

لیتر)، SDS (۱۰ درصد به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر) و آب مقطر استریل (۸۸ میلی‌لیتر) به آن افزوده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای 20°C قرار داده شد. در ادامه $200\ \mu\text{l}$ از $20\ \text{M}$ NaCl به آن اضافه و به‌مدت ۴۰ دقیقه در 20°C باقی ماند. بعد از آن نمونه‌ها در 15000 دور به‌مدت پنج دقیقه در دمای 4°C سانتریفوژ شد. محلول رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد و به مقدار $2/5-1/5$ برابر محلول برداشته شده به آن اتانول سرد (20°C) اضافه و سانتریفوژ شد. پلت ایجاد شده با اتانول ۷۰٪ دو بار شست و شو شد و پس از خشک کردن آن، در محلول TE (محتوی Tris به غلظت ۱۰ mM و EDTA به غلظت mM) حل شد رول و همکاران (Rolle et al., 2005).

جدول ۱: ویژگی‌های آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای تکثیر ژن *Cry1* و زیر مجموعه‌های آن در باکتری *Bacillus thuringiensis*
Table 1: Characteristics of general and specific primers for amplification of *cry1* and its subset genes in *Bacillus thuringiensis*

آغازگر Primer	توالی ^a Sequence	موقعیت Positions	ژن Gene	اندازه‌ی محصول (bp) Product size (bp)	شماره دسترسی بانک ژن Gen Bank Accession No.
<i>Cry1(F)</i>	5'-tracrhtddbdgtattagat-3'	726	<i>Cry1</i>	1542	
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'	2268			
<i>Cry1Aa(F)</i>	5'-ttccctttatttgggaatgc-3'	1023	<i>Cry1Aa</i>	1268	M11250
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'	2268			
<i>Cry1Ab(F)</i>	5'-cggatgctcatagaggagaa-3'	940	<i>Cry1Ab</i>	1371	M13898
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1Ac(F)</i>	5'-ggaaactctttttaatgg-3'	1452	<i>Cry1Ac</i>	844	M11068
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1Ad(F)</i>	5'-accgactgactctcaacta-3'	1057	<i>Cry1Ad</i>	1212	M73250
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1B(F)</i>	5'-ggctaccaatactctatta-3'	1063	<i>Cry1B</i>	1323	X06711
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1C(F)</i>	5'-atttaattacgtggttg-3'	1160	<i>Cry1C</i>	1176	X07518
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1D(F)</i>	5'-caggccttgacaattcaaat-3'	1126	<i>Cry1D</i>	1138	X54160
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1E(F)</i>	5'-tagggataaatgtatgacag-3'	1155	<i>Cry1E</i>	1137	X53985
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1F(F)</i>	5'-gatttcaggaagtgttcacat-3'	1302	<i>Cry1F</i>	967	M63897
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1G(F)</i>	5'-gggtctcaaatgacgtgta-3'	1300	<i>Cry1G</i>	1128	Z22510
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1H(F)</i>	5'-actctttcacaccaataac-3'	1696	<i>Cry1H</i>	572	Z22513
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1I(F)</i>	5'-acaatttacagcttattaag-3'	1027	<i>Cry1I</i>	1000	X62821
<i>Cry1I(R)</i>	5'-ctacatgttacgctcaatat-3'	2141			
<i>Cry1J(F)</i>	5'-gcgcttaataattttacc-3'	1162	<i>Cry1J</i>	1106	L32019
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				
<i>Cry1K(F)</i>	5'-tgatgatatttcgaacc-3'	1245	<i>Cry1K</i>	1043	U28801
<i>Cry1(R)</i>	5'-mdatyctaktcttgacta-3'				

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

الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲٪ انجام شد. برای رنگ آمیزی، ژل مورد نظر به مدت ۵-۱۰ دقیقه در داخل محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت. پس از انجام رنگ آمیزی، ژل به آرامی با آب مقطر شسته شد. عکس برداری از ژل با استفاده از دستگاه ژل خوان کداک (GEL LOGIC 200) صورت گرفت.

نتایج

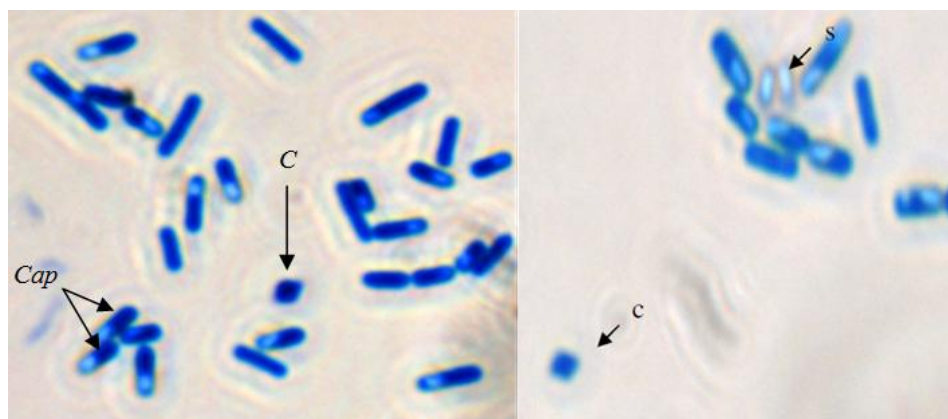
جداسازی و شناسایی سویه ها براساس شاخص های مورفولوژیک

در ابتدا براساس شکل ظاهری کلنی Bt (سفید مات) از ۳۲ نمونه خاک جنگلی مناطق مختلف استان مازندران تعداد ۱۴۴ جدایه گزینش گردید. پس از انجام رنگ آمیزی با کوماسی بلو شناسایی جدایه ها بر مبنای شاخص های میکروسکوپی (تولید اسپور، کلاهک و کریستال) انجام شد (شکل ۲). شناسایی میکروسکوپی Bt عموماً از طریق میکروسکوپ فاز کنتراست انجام می شود که کریستال ها به رنگ تیره و اسپورها (در فاز روشن) دیده می شوند کائور (Kaur, 2006). بدین ترتیب در ۳۲/۶۳٪ از سویه ها پروتئین های کریستالی شکل مشاهده گردید (جدول ۲).

ردیابی مولکولی ژن *Cry1* و زیرمجموعه های آن

اجزای واکنش زنجیره ای پلی مرز بهینه شده برای ژن های *Cry1* در حجم ۲۵ μl شامل: ۲ μl از DNA، ۰/۵ μl از dNTP (غلظت نهایی: ۰/۲ mM)، ۰/۲ μl آنزیم Taq DNA Polymerase (مقدار نهایی: یک واحد)، ۲ μl از هر کدام از آغازگرها (غلظت نهایی ۰/۸ μM)، ۱ μl از MgCl₂ (غلظت نهایی: ۲ mM)، ۲/۵ μl بافر PCR (مقدار نهایی ۱X) و ۱۴/۸ μl آب مقطر استریل بود. مراحل واکنش به ترتیب شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه، چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۴۵°C و مرحله طولی شدن به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲°C و طولی شدن نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲°C بود.

اجزای واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ۱۴ زیرمجموعه ی ژن *Cry1* با ایجاد تغییرات جزئی در مقدار MgCl₂ و دمای مرحله اتصال در چند ژن بهینه سازی گردید که عبارتند از: *Cry1C* و *Cry1I* مقدار MgCl₂ از ۱ μl به ۰/۷۵ μl کاهش و دمای مرحله ی اتصال از ۴۵°C به ۴۶°C افزایش یافت. در مورد *Cry1J* و *Cry1D* تنها میزان MgCl₂ به ۰/۷۵ کاهش یافت. اجزای PCR سایر ژن ها مشابه با *Cry1* بود.



شکل ۲: کریستال (c)، اسپور (s) و کلاهک (cap) باکتری *Bacillus thuringiensis* (بزرگ نمایی ×۱۰۰)
Fig. 2: Crystal (c), spore (s) and cap of *Bacillus thuringiensis* (enlarge× 100)

شناسایی سویه های دارای ژن *Cry1*

پس از بهینه سازی و انجام مراحل استخراج DNA، این جدایه ها با استفاده از آغازگر *Cry1* تحت واکنش PCR قرار گرفتند. از بین آنها هفت سویه حاوی ژن *Cry1* در اندازه های مورد انتظار (۱۶۰۰-۱۵۰۰ bp) بودند (شکل ۳) و هفت سویه دیگر نیز قطعات کوچک تر (حدود ۶۰۰-۵۰۰ bp) تولید نمودند که نیازمند توالی یابی و بررسی های بیشتر است.

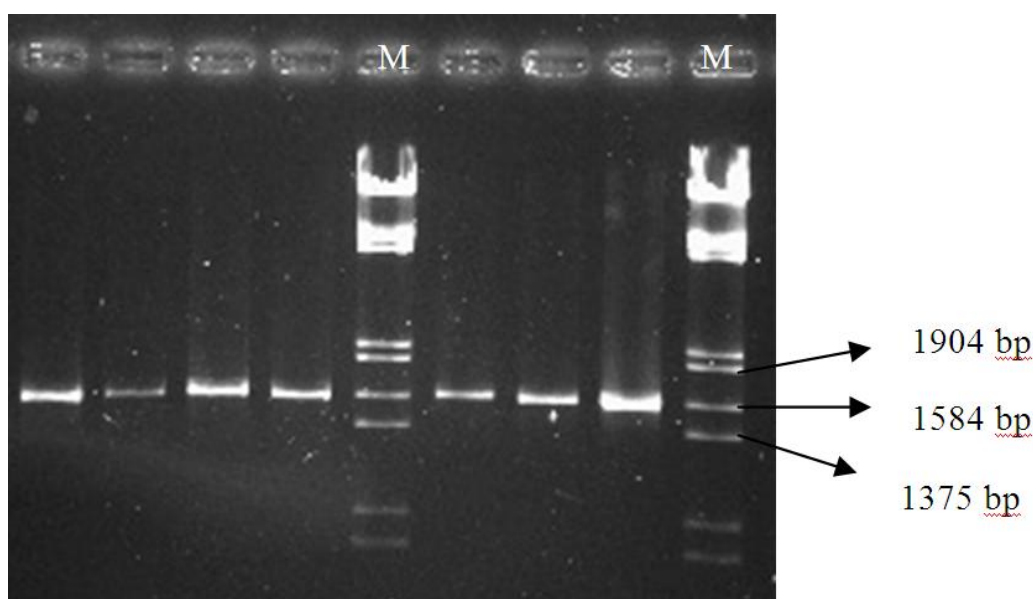
بررسی ساختار ژنی سویه های Bt

از آنجا که ژن های تولید کننده پروتئین کریستالی بر روی DNA پلازمیدی این باکتری قرار دارد با انجام تغییرات مختلف بهترین شیوه استخراج DNA برای این باکتری ها بهینه سازی شد و به جهت اطمینان بیشتر DNA هر ۴۷ سویه ی تولید کننده ی اسپور، کلاهک و کریستال به همراه ۱۵ سویه ی تولید کننده ی اسپور و کلاهک استخراج و برای انجام آزمایش های بعدی آماده گردید.

جدول ۲: توزیع سویه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* تولیدکننده‌ی اسپور، کلاهک و کریستال در خاک‌های جنگلی استان مازندران

Table 2: Distribution of spore, cap and crystal forming isolates of *Bacillus thuringiensis* in forest soil samples of Mazandarn province

تعداد سویه‌ها Total of strains	تعداد سویه‌های تولیدکننده اسپور Total of spore forming strains	تعداد سویه‌های تولیدکننده کلاهک و کریستال Total of spore and cap forming strains	تعداد سویه‌های تولیدکننده کریستال Total of crystal forming strains	درصد سویه‌های تولیدکننده کریستال Percentage of crystal forming strains
144	82	15	47	32.63



شکل ۳: تکثیر اختصاصی ژن *Cry1* (۱۵۰۰-۱۶۰۰ bp) در هفت جدایه بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* (M: نشانگر مولکولی وزنی)

Fig. 3: Specific amplification of *Cry1* (1500-1600 bp) in seven native *Bacillus thuringiensis* isolates (M: Molecular weight marker)

در این بررسی، ژن‌های *Cry1Ac* و *Cry1I* در تمامی سویه‌ها یافت شدند، اما ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1E* و *Cry1G* در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشدند. در برخی از سویه‌ها ژن‌های *Cry1D*، *Cry1F*، *Cry1J* و *Cry1K* در اندازه‌های متفاوت از آنچه مورد انتظار بود، تکثیر شدند. تولید مداوم و تکثیر مناسب این قطعات متفاوت در سویه‌های موردنظر نشان‌دهنده اندازه متفاوت این ژن‌ها در این سویه‌های بومی است. توالی‌یابی این قطعات و مقایسه آن با توالی‌های استاندارد، دلیل اختلاف در طول قطعات تکثیری را مشخص خواهد کرد. در برآورد فراوانی هر یک از ژن‌ها (شکل ۴) تکثیر مثبت بدون لحاظ اندازه قطعه، مبنا قرار گرفت.

هفت سویه حاوی ژن *Cry1* نامگذاری و نحوه پراکنش آنها در نمونه‌های خاک شهرستان‌های مختلف استان تعیین گردید. از نمونه‌های خاک جنگلی مورد بررسی در ۱۶ شهرستان استان، سویه‌های Bt پنج شهرستان (نور، ساری، سوادکوه، محمودآباد و بهشهر) دارای ژن *Cry1* بودند که بیشترین فراوانی در نمونه‌های خاک شهرستان نور با سه سویه و چهار شهرستان دیگر هر کدام با یک سویه محتوی این ژن بودند.

بررسی زیرگروه‌های ژن *Cry1*

پتانسیل سمیت سویه‌های Bt به نوع و زیرگروه‌های ژن *Cry* آن وابسته است / پایدین و همکاران (2008). در جدول (۳) تنوع ژنی این هفت سویه براساس الگوهای بانندی به‌دست آمده ارائه شده است.

نوع نیمرخ ژنی متفاوت هستند. سویه NR2 با سه ژن، حداقل تنوع را دارا بود (جدول ۵). سایر سویه‌ها دارای تعداد بیشتری از ژن‌های زیر مجموعه *Cry1* بودند. متنوع‌ترین نیمرخ ژنی در این اکوسیستم با هشت زیر مجموعه ژنی *Cry1* در سویه MA1 مشاهده شد (شکل ۵).

نیمرخ‌های مختلف ژن *Cry1*

آگاهی از نیمرخ‌های ژنی مختلف در باکتری Bt می‌تواند احتمال به‌کارگیری آنها را در برابر طیف وسیعی از حشرات آفت افزایش داده و باعث کارایی بیشتر برنامه‌های مبتنی بر کاربرد Bt شود. نتایج نشان داد که این هفت سویه دارای هفت

جدول ۳: ساختار ژنی *Cry1* در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* جداسازی شده از خاک‌های جنگلی استان مازندران
Table 3: Characterization of *Cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from the forest soil samples of Mazandaran province.

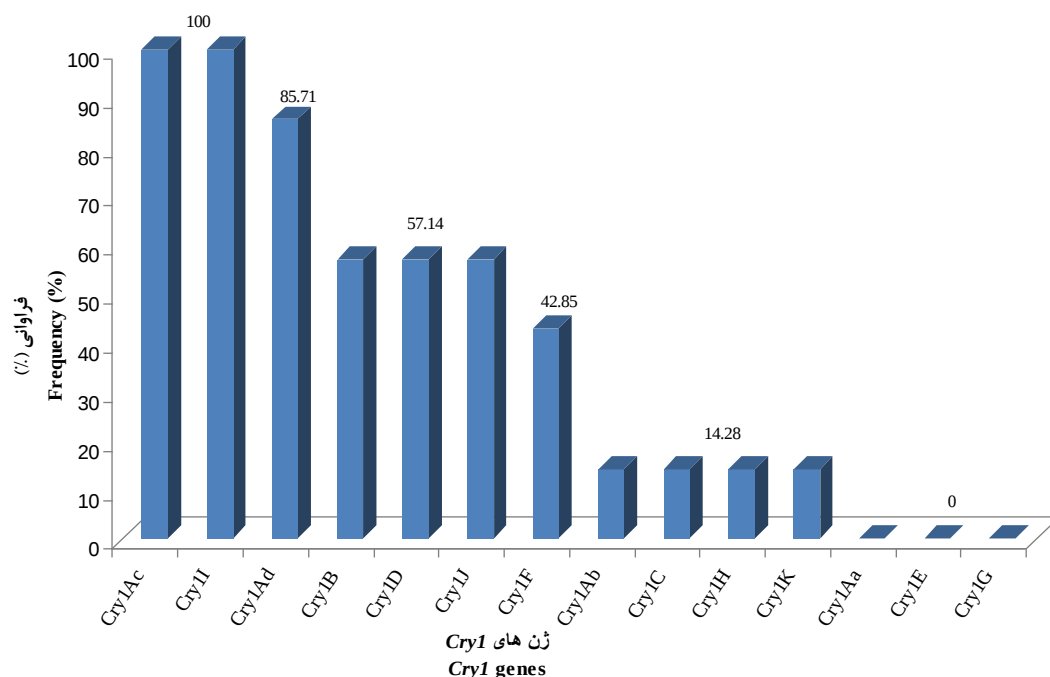
سویه‌ها Strains							ژن‌ها Genes
BH1	MA1	SK1	SR1	NR3	NR2	*NR1	
-	-	-	-	-	-	**_	<i>Cry1Aa</i>
-	+	-	-	-	-	-	<i>Cry1Ab</i>
+	+	+	+	+	+	+	<i>Cry1Ac</i>
+	+	+	+	+	-	+	<i>Cry1Ad</i>
-	+	+	+	+	-	-	<i>Cry1B</i>
-	+	-	-	-	-	-	<i>Cry1C</i>
-	+	+	-	-	±	±	<i>Cry1D</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Cry1E</i>
-	-	+	±	+	-	-	<i>Cry1F</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Cry1G</i>
-	+	-	-	-	-	-	<i>Cry1H</i>
+	+	+	+	+	+	+	<i>Cry1I</i>
±	-	±	±	±	-	-	<i>Cry1J</i>
-	-	-	±	-	-	-	<i>Cry1K</i>

* سویه‌ها: NR: شهرستان نور، SR: ساری، SK: سوادکوه، MA: محمودآباد و BH: بهشهر

** علائم -، + و ± به ترتیب به معنی: بدون تکثیر، تکثیر ژن در اندازه مورد انتظار و تکثیر ژن در اندازه غیرقابل انتظار

* The Isolates: NR: Noor, SR: Sari, SK: Savadkooh, MA: Mahmoud abad, BH: Behshahr

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

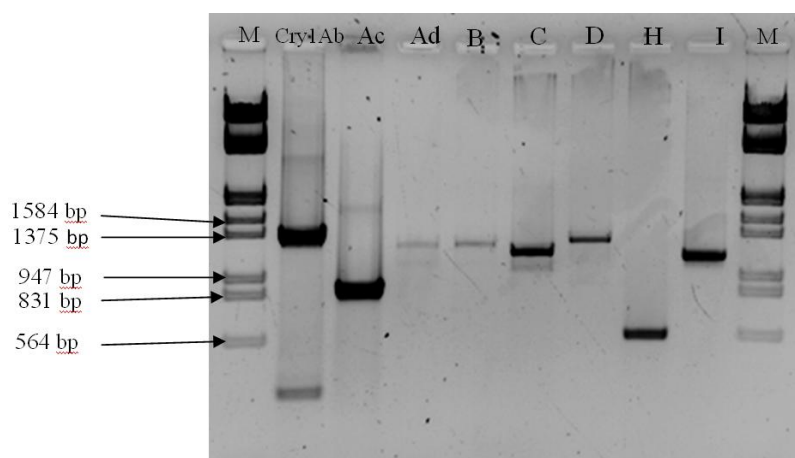


شکل ۴: فراوانی انواع ژن‌های *Cry1* در سویه‌های *Bacillus thuringiensis* به‌دست آمده از خاک‌های جنگلی استان مازندران
Fig. 4: *Cry1* genes abundance in detected *Bacillus thuringiensis* isolates from the forest soil samples of Mazandaran province

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

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

نام سویه Strains	نیم‌رخ‌ها Profiles
MA1	<i>Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1H, Cry1I</i>
SR1	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1F, Cry1I, Cry1J, Cry1K</i>
SK1	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1D, Cry1F, Cry1I, Cry1J</i>
NR3	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1F, Cry1I, Cry1J</i>
BH1	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1I, Cry1J</i>
NR1	<i>Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1D, Cry1I</i>
NR2	<i>Cry1Ac, Cry1D, Cry1I</i>



شکل ۵: نیم‌رخ ژنی سویه MA1 از باکتری *Bacillus thuringiensis* (M: نشانگر مولکولی وزنی)
Fig. 5: Gene profile for MA1 strain of *Bacillus thuringiensis* (M: Molecular weight marker)

بحث

پس از معرفی و توصیف PCR برای شناسایی ژن‌های *Cry* باکتری *Bt* کاروزی و همکاران (Carozzi et al., 1991)، این شیوه به‌عنوان یک ابزار مولکولی برای پیش‌بینی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری پیشنهاد شد. از این ابزار برای تکثیر بخش‌های خاصی از DNA و همچنین تعیین وجود و یا عدم‌وجود یک ژن هدف استفاده می‌شود پارکر و خوآرز-پرز (Porcar and Juarez-Perez, 2003). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز روشی سریع، دقیق و مطمئن برای ردیابی ژن‌های مختلف در باکتری *Bt* است. شیوه‌های سنتی زیست‌سنجی حشرات نیازمند پرورش تعداد زیادی حشره بوده و انجام تیمارهای مختلف زمان زیادی می‌برد. از این رو، شناسایی مولکولی سویه‌های موثر می‌تواند بخوبی جایگزین شیوه‌های سنتی شود. همچنین با این روش می‌توان از ساختار ژن‌های *Cry* سویه‌های بومی آگاهی یافت و قابلیت حشره‌کشی آنها را پیش‌بینی کرد.

کیم و همکاران (Kim et al., 1998a) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ۹ ژن *Cry1* را در ۱۶۳ سویه *Bt* جداسازی شده از انبار غلات مورد بررسی قرار دادند. ژن - *Cry1Ab* (۴۷٪) فراوان‌ترین و ژن‌های *Cry1G* (۲٪) و *Cry1E* (۱٪) دارای کمترین فراوانی بودند.

در پژوهش دیگر کیم و همکاران (1998b) از ۵۸ سویه *Bt* جداسازی شده از خاک، ژن‌های *Cry1C* (۵۷٪) و *Cry1Ab* (۴۵٪) فراوان‌ترین ژن‌ها بودند و ژن‌های *Cry1E* و *Cry1F* در هیچ یک از سویه‌ها یافت نشدند.

در تحقیق مشابهی در ایران از ۷۰ سویه *Bt*، ۳۴ سویه (۴۹٪) دارای ژن *Cry1* بودند. ژن *Cry1I* (۱۰۰٪) دارای بیشترین فراوانی بوده و ژن‌های *Cry1B*، *Cry1G*، *Cry1H* و *Cry1K* یافت نشدند. همچنین ژن‌های *Cry1C*، *Cry1E* و *Cry1J* در برخی از سویه‌ها در اندازه‌های غیرقابل انتظار مشاهده شدند سیفی‌نژاد و همکاران (Seifinejad et al., 2008). در هند نیز با بررسی سویه‌های *Bt* موثر روی حشرات راسه‌های بالپولکداران و سخت‌بالپوشان، ژن *Cry1I* با بیشترین فراوانی (۷۱/۰۵٪) مشاهده شد پوجا و همکاران (Pooja et al., 2013).

جستجو برای یافتن سویه‌های *Bt* از منابعی به‌جز خاک نیز نتایج متغیری به‌همراه داشته است. آپادین و همکاران (2008) ۱۰ ژن زیر مجموعه *Cry1* را در ۳۶ سویه به‌دست آمده از انبار غلات شناسایی نمودند. ژن‌های *Cry1E* (۱۰۰٪)، *Cry1Aa* (۹۵٪)، *Cry1Ac* (۹۱٪) بیشترین فراوانی و ژن‌های *Cry1Ab* (۷٪)، *CryAd* (۶٪) و *Cry1B* (۳٪) کمترین فراوانی را داشتند.

در کشور سوریه از ۴۰ 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* (۳۴٪ سویه) با بیشترین فراوانی و ژن *Cry1D* (۴٪ سویه) با کمترین فراوانی مشاهده گردید آمونه و همکاران (Ammoun et al., 2013).

احتمالاً تفاوت‌های مشاهده شده در محتویات ژنتیکی ژن‌های *Cry* ناشی از تفاوت اکولوژیک مناطق مختلف از جمله پوشش گیاهی، تنوع حشرات میزبان و تنوع فون خاک در نواحی متفاوت جغرافیایی است مارتین و تراورز، کیم و همکاران (Martin and Travers, 1989; Kim et al., 1998b). نقش فرآیند پیوستگی در باکتری‌ها که طی آن، تبادل ژنتیکی بین دو باکتری منجر به ایجاد باکتری‌های نو ترکیب با محتویات ژنتیکی جدیدی می‌شود نیز مورد توجه است مخدوم (Makhdoom, 1998).

علی‌رغم تفاوت‌ها و تنوعی که در نتایج دیده می‌شود، فراوانی برخی ژن‌ها در منابع و نواحی مختلف تقریباً مشابه است. در پژوهش حاضر ژن‌های *Cry1Aa*، *Cry1E* و *Cry1G* یافت نشده و ژن‌های *Cry1Ab*، *Cry1C*، *Cry1H* و *Cry1K* نیز فراوانی کمی داشتند. این ژن‌ها در برخی از مطالعات کمتر مشاهده شده و یا در برخی اصلاً مشاهده نشدند کیم و همکاران، مارتینز و همکاران، آری‌یتا و اسپینوزا، آرمنگول و همکاران (Kim et al., 1998a; Kim et al., 1998b; Martinez et al., 2005; Arrieta and Espinoza, 2006; Armengol et al., 2007).

با دسته‌بندی نیمرخ‌های ژنی در بین هفت سویه یافت شده در تحقیق حاضر، هفت نوع نیمرخ ژنی مختلف از ۳ تا ۸ ژن مشاهده شد که متنوع‌ترین نیمرخ دارای هشت ژن *Cry1Ab*، *Cry1Ad*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1H* و *Cry1I* بود.

درحالی‌که در پژوهش مشابه دیگری که در ایران انجام شد از ۳۴ سویه محتوی ژن *Cry1*، ۲۲ نیمرخ ژنی مختلف از ۱ تا ۹ ژن مشاهده شد. متنوع‌ترین نیمرخ ژنی دارای نه ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ad*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E* و *Cry1F* بود که در یک‌سویه (۲/۹٪) ردیابی شد سیفی‌نژاد و همکاران (2008).

در پژوهش‌های دیگر از ۳۱ سویه محتوی ژن *Cry1*، تنها ۱۳ نیمرخ ژنی (۴۲٪) مختلف آری‌یتا و اسپینوزا (2006) و از ۱۸ سویه دارای ژن *Cry1*، چهار نوع نیمرخ مختلف به‌دست آمد که متنوع‌ترین توالی با پنج ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1B* و *Cry1D* بود که در ۱۴ سویه (۷۷/۷٪)

مشاهده شد *آرمنگول* و همکاران (2007). *آپیدین* و همکاران (2008) در ترکیه از ۳۶ سویه دارای ژن *Cry1*، ۱۸ نیمرخ ژنی مختلف (از ۲ تا ۹ ژن) ردیابی نمودند که متنوع‌ترین آن با ۹ ژن *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1B*، *Cry1C*، *Cry1D*، *Cry1E*، *Cry1F* و *Cry1G* مشاهده گردید.

نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های بومی Bt جداسازی شده از خاک‌های جنگلی استان مازندران از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار هستند. از آنجا که خاک‌های جنگلی تنوع زیستی بالایی دارند، انتظار می‌رفت که سویه‌های

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۷-۱۸ متن انگلیسی مراجعه شود.

متعددی از Bt یافت شود. علاوه بر این وجود چندین نیمرخ ژنی در سویه‌ها (بین ۳ تا ۸ زیر مجموعه مربوط به *Cry1*) نشان‌دهنده قابلیت مناسب این سویه‌ها به عنوان آفتکش زیستی بومی است. انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی با استفاده از این سویه‌ها روی یک یا چند آفت از راسته بالپولکداران، توصیف دقیق‌تری از قابلیت کاربرد عملی آنها در اختیار خواهد گذاشت که امید است پس از طی مراحل تکمیلی، در برنامه‌های کنترل بیولوژیک و مدیریت تلفیقی آفات مورد استفاده قرار گیرند.