تشخیص و اندازه‌گیری بتا اگزوتوکسین در جدایه‌های ایرانی *Bacillus thuringiensis*

سودابه ایزدیار[۱]، خلیل طالبی جهرمی[۲]، حسن عسکری[۳]، محمدرضا رضاپناه[۱]

چکیده

دوازده جدایه‌ی ایرانی *B. thuringiensis* از نظر وجود بتاگزوتوکسین به دو روش زیست‌سنجی و HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج زیست‌سنجی سوپرناتانت عاری از اسپور و کریستال جدایه‌ها روی لاروهای چهار روزه کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) نشان داد که بعضی از جدایه‌ها دارای عاملی کشنده هستند که می‌تواند بتاگزوتوکسین باشد. برای تایید این نتایج، سوپرناتنت جدایه‌های مورد آزمایش با استفاده از HPLC مورد تجزیه و اندازه‌گیری قرار گرفت و با بتاگزوتوکسین استاندارد مقایسه شد. جدایه‌های Krm23، Kn4، 3R و 4t دارای بتاگزوتوکسین بودند. سوپرناتنت غلیظ جدایه Krm23 با ۷/۳۷ و جدایه 3R با ۲۹۴/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب کمترین و بیشترین میزان بتاگزوتوکسین را دارا بودند. مقایسه نتایج روش زیست‌سنجی و روش HPLC نشان داد که درصد تلفات کرم غوزه پنبه با میزان بتاگزوتوکسین اندازه‌گیری شده تطابق دارد و تایید شد.

واژگان کلیدی: جدایه‌های ایرانی *Bacillus thuringiensis*، بتاگزوتوکسین، کرم غوزه پنبه، کروماتوگرافی HPLC، زیست‌سنجی

۱- مؤسسه‌ی تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، تهران
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج
۳- مؤسسه‌ی تحقیقات جنگلها و مراتع، بخش تحقیقات حمایت و حفاظت، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵، تهران
این مقاله در تاریخ ۱۳۸۲/۲/۳۰ دریافت و چاپ آن در تاریخ ۱۳۸۲/۴/۱۰ به تصویب نهایی رسید.

مقدمه

در حال حاضر باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner. به عنوان شاخص‌ترین عامل بیماریزا در کنترل بیولوژیک آفات گیاهی بشمار می‌آید و جدایه‌های بومی آن می‌توانند نسبت به حشره‌کشهای میکروبی تجارتی‌از برتری برخوردار باشد. این باکتری دارای چندین توکسین است که بعضی مفید و بعضی مضر می‌باشند. بتا اگزوتوکسین یکی از این توکسین‌هاست که اثرات مضر روی پستانداران و حشرات مفید دارد.

این توکسین یک ماده تراوشی مقاوم به حرارت و محلول در آب است. در مرحله‌ی رشد باکتری بداخل محیط ترشح شده و در مرحله شفیره شدن و پوست‌اندازی روی حشرات راسته‌های Diptera، Lepidoptera و Colcoptera تاثیر می‌گذارد. اثر گوارشی آن کمتر از تزریق آن به داخل هموسل است. در پشه‌ها، اگزوتوکسین خورده شده، می‌تواند لارو و حشره‌ی بالغ را از بین ببرد.

غلظتهای زیرکشنده سبب تاخیر در پوست‌اندازی، ناهنجاری جنینی در حشره، کاهش طول عمر، زادآوری و اندازه تخم مگس‌ها می‌شود. ساختمان مولکولی آن شبیه به ATP بوده و ممانعت کننده اختصاصی RNA پلیمراز وابسته به DNA است. روی پوست‌اندازی و متامورفوز حشره اثر گذاشته و شفیره‌ها و حشرات بالغ بدشکل و یا ناقص می‌شوند که یا غیرباروروند و یا زادآوری و طول عمر آنها کاهش می‌یابد (۱۲).

چنانچه فرآورده‌ای حاوی سم بتااگزوتوکسین باشد در برخی از کشورها از تولید آن جلوگیری می‌شود. پروسه ارزیابی تولید Bt. شامل ردیابی بتااگزوتوکسین بوده و برای جلوگیری از وجود آن در محصولات رعایت این مرحله ضروری است. تولید اگزوتوکسین مقاوم به حرارت در ۷۴۰ استرین Bt. و باکتریهای وابسته با استفاده از مگس خانگی بررسی شده است (۹).

در یک زیست‌سنجی اثر بتااگزوتوکسین روی سن شکارگر *Geocoris punctipes* بررسی گردید (۶). آزمایش روی پوره‌ها و حشرات کامل که در آزمایش‌های صحرایی آلوده شده بودند، انجام و مشخص گردید که تغذیه از شکارآلوده به بتااگزوتوکسین می‌تواند سبب مرگ و میر این شکارگر گردد.

هوفلـــر و همکـساران (۵) اگزوتوکیـــین حـــاصل از زیـــر گونـــه Morisoni را روی لارو *Haematobia irrttansei* آزمایش کردند. میزان مرگ و میر برای لارو حشره در غلظت‌هـای ۱، ۳ و ۵ میکروگرم در گرم ماده غذایی به ترتیب ۱۲/۸، ۴۴/۶ و ۸۱/۵ درصد بود و در مورد مـــوش میزان LD_{50} به طور متوسط برای نرها و ماده‌ها ۱۵۵ µg/g بود. همچنین بـــا اسـتفاده از دسـتگاه HPLC پیک اگزوتوکسین را مشخص کردند.

لوینسون و همکاران (۸) روش تغییر یافتـــه HPLC را بـرای آشکارسـازی و تعییـن کمیـت بتاگزوتوکسین استفاده کردند. آنها توانستند در ۵ اسـترین از سـه زیـر گونـه نـوع جدیـدی از بتاگزوتوکسین را از زیرگونه Morrisoni جداسازی نمایند.

آزمـایش دو سـروتیپ .Bt کـــه یکـــی از آنـــها بـــدون اگزوتوکســین و دیـگری دارای بتاگزوتوکسین بود روی سالمونلا نشان داد که هیچکدام از آنها اثر جهش زایی روی سـالمونلا نداشتند (۲).

پرانی و همکاران (۱۱) جدایـه‌های جدیـد را از نظـر وجـود اگزوتوکسـین تسـت کردنـد. آزمایش روی مگس خانگی انجام شد. میزان ۳ میلی‌لیتر از سـوپرناتـانت اتوکـلاو شـده بـه ۲۲ میلی‌لیتر ماده غذایی اضافه گردید. شاهدهای مثبت و منفی نیز در آزمایش در نظر گرفتـه شـد. لاروها تا زمانیکه مرده و یا شفیره گردیدند روی غذا پرورش داده شدند. مرگ در هر مرحله از زندگی و یا عدم موفقیت در شفیره شدن دلالت بر وجود بتا اگزوتوکسین داشت. شفیره شـــدن و ظهور بالغین تاییدی بر عدم وجود بتاگزوتوکسین در استرین بود. به این ترتیـب آنـها نشـان دادند که ۵۸ درصد جدایه‌ها دارای بتاگزوتوکسین بودند.

در بررسی حـــاضر دوازده جدایـه بومی ایرانـی از نظـر مـیزان بتـاگزوتوکسـین بـه روش زیست‌سنجی و نیز کروماتوگرافی HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دوازده جدایه‌ی ایرانی .Bt که به روش‌های متفاوت (۱ و ۱۰) از خاک‌های منـاطق جنگلـی شمال کشور و خاک‌های زراعی نقاط مختلف ایران جدا گردیده بود آزمایش شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ایرانی *Bacillus thuringiensis*

کد جدایه‌ها	محل جمع‌آوری	بستر	روش جداسازی
3R	رشت (رستم آباد)	خاک جنگل	Ohba and Aizawa 1986
5R	//	//	//
6R	//	//	//
2t	ساری (دشت ناز)	مزرعه توتون	//
4t	//	//	//
E4	ساری (جویبار)	خاک جنگل	//
11C	نوشهر (سی‌سنگان)	//	//
Dh11	ایلام (دهلران)	خاک مزرعه	Anwar Hossein et al., 1997
Krm4	کرمانشاه (کرمانشاه)	//	//
Crp19	کرمانشاه (سرپل ذهاب)	//	//
Krm23	کرمانشاه (کرمانشاه)	//	//
Kn4	کرمانشاه (کنگاور)	//	//

خالص‌سازی بتااگزوتوکسین: ابتدا جدایه‌های .Bt روی محیط کشت مایع نوترینت بـراث (N. B) کشت داده شد. برای هر جدایه ۳ ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری (۳ تکرار) در نظر گرفتـه شـد و در هر ارلن میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با باکتری ریخته شد. سپس مخلوط بـاکتری و محیط کشت توسط شیکر انکوباتوردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بـا ۱۵۰ دور در دقیقـه بمدت ۷۲ ساعت تکان داده شد. بعد از این مدت ضمن کنترل کیفی محیط‌های کشت از طریق شمارش سلولی باکتری و تهیه لام و رنگ‌آمیزی باکتری به خالص بودن و عدم آلودگی محیـط کشت اطمینان حاصل شد. سپس اسپورها و کریسـتالهای تولیـد شـده از محیـط غذایـی مـایع بوسیله‌ی سانتریفوژ به مدت یکساعت با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه از یکدیـگر جـدا گردیـد. بخش مایع (سوپرناتانت) بدست آمده در سه ارلن مختلف با یکدیگر مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شـد. سـوپرناتنت‌هـا (1x) بوسـیله‌ی دسـتگاه

تبخیر کننده دوار، تبخیر شده و با کاهش حجم آن از ۳۰۰ میلی‌لیتر به ۱۰ میلی‌لیتر، ۳۰ بار تغلیظ گردیدند (30x).

ارزیابی بتاگزوتوکسین جدایه‌ها با روش زیست‌سنجی: برای انجام زیست‌سنجی از روش جانسون و همکاران (۷) استفاده گردید. آزمایش با دو غلظت 1x و 30x سوپرناتانت بدست آمده از مرحله قبل انجام شد. هر جدایه بومی .Bt به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد و برای هر تیمار ۳ تکرار و هر تکرار ۱۵ عدد لارو چهار روزه کرم غوزه پنبه از انستکتاریوم بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک در شرایط دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت‌نسبی ۵±۶۰٪ و ۱۶ ساعت روشنائی در شبانه‌روز در نظر گرفته شد.

آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام آزمایش ۶ میلی‌لیتر از سوپرناتانت با غلظت 1x و 30x به ۴۴ میلی‌لیتر غذای مصنوعی لاروها اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید. مقدار ۱/۱ گرم از غذای حاوی سوپرناتانت داخل قوطی فیلم ریخته شده و یک عدد لارو چهار روزه کرم غوزه پنبه داخل آن قرار گرفت. آزمایش شامل دو شاهد بود. شاهد منفی، غذای مصنوعی با آب مقطر استریل و بدون سوپرناتانت و شاهد مثبت، غذای مصنوعی با بتاگزوتوکسین خالص دریافتی از انستیتوپاستور فرانسه با مشخصات Roger Belon, Ref. 333 بود. بعد از شروع آزمایش هر ۴۸ ساعت مرگ و میر لاروها یادداشت گردید. نمونه‌برداری تا پایان دوره پرورش یعنی زمانیکه همه لاروها مردند و یا شفیره گردیدند، ادامه داشت. پس از ۱۵ روز درصد تلفات با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروهبندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۱٪ = α انجام شد.

اندازه‌گیری بتاگزوتوکسین به روش کروماتوگرافی: برای اندازه‌گیری بتاگزوتوکسین به روش HPLC از روش لوینسون و همکاران (۸) استفاده گردید. از پودر بتاگزوتوکسین خالص، محلول ppm ۲۵۰ در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH= ۳ تهیه و ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. منحنی کالیبراسیون و پیک آن ثبت گردید. مشخصات دستگاه HPLC که در بررسی بکار رفت به شرح زیر بود:

پمپ	Bisch-off
ستون (فاز معکوس)	Knauer C18
دتکتور	Kanuer
دستگاه ثبات	Shimadzu
سرعت فاز متحرک	1 ml/min
فاز متحرک	KH_2PO_4 (pH=3)
طول موج	260 nm

از محلول تغلیظ شده (30x) هر جدایه، پودرخشک تهیه و سپس این پودر در یک سوم حجم نهایی آن در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار حل گردید و pH آن بوسیله اسیدفسفریک ۸۵ درصد که به نسبت یک به بیست رقیق شده بود به ۳ رسید. محلول فوق به مدت یکساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا رسوب زردرنگ تشکیل گردد. سپس این رسوب توسط سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۳۰ دقیقه جدا شد. از مایع روئی بعد از صاف کردن، به میزان ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و نمودار آنها ثبت گردید (شکل ۱). تحت شرایط آزمایش زمان بازداری برای پیک اگزوتوکسین حدود ۱۱/۶۸۵ دقیقه بود. چون در مقایسه با پیک استاندارد، بعضی از جدایه‌ها مشکوک به وجود بتااگزوتوکیین شدند، لذا برای اطمینان بیشتر و تایید این موضوع که منحنی‌های مورد نظر مربوط به بتااگزوتوکسین است، مجدداً ۱۵ میکرولیتر از جدایه مشکوک، به اضافه ۵ میکرولیتر از محلول استاندارد ppm ۲۵۰ یعنی در مجموع ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید و پیک آن ثبت شد. وجود پیکی با یک قله واحد تاییدی بر این موضوع است که پیک رویت شده مربوط به اگزوتوکسین می‌باشد. مقادیر بتااگزوتوکسین با استفاده از سطح زیر پیک و منحنی کالیبراسیون محاسبه گردید.

نتایج

ارزیابی بتااگزوتوکسین جدایه‌ها با روش زیست‌سنجی: میانگین درصد تلفات زیست سنجی بتااگزوتوکسین با دو غلظت 1x و 30x از سوپرناتانت عاری از اسپور و کریستال جدایه‌های بومی .Bt و دو شاهد مثبت و منفی روی کرم غوزه پنبه پس از ۱۵ روز در جداول ۲

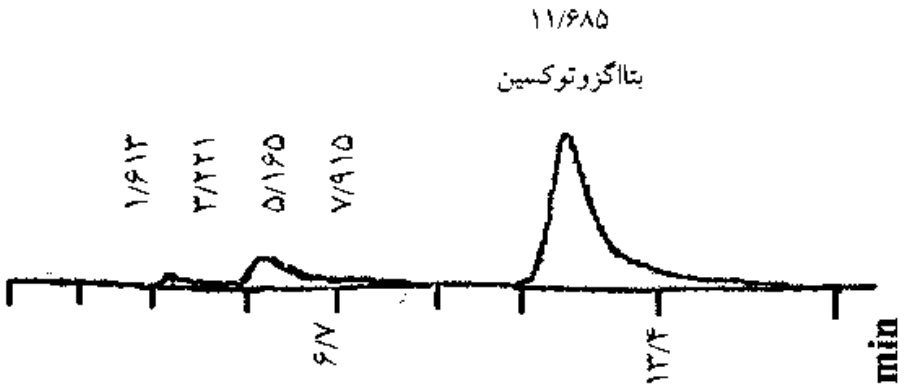
و ۳ ثبت گردیده است. تجزیه واریانس آنها حاکی از اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ بین تیمارها می‌باشد. آنها با روش دانکن گروه‌بندی شده‌اند.

مقایسه میانگین تیمارها در غلظت 1x نشان می‌دهد که بین تیمارها از نظر تلفات لارو کرم غوزه پنبه در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بتاااگزوتوکسین خالص با ۱۰۰ درصد تلفات در گروه A قرار گرفته است. جدایه‌های شماره ۹، ۵ و ۳ با ۲۴/۴۰، ۲۴/۴۰ و ۱۵/۵ درصد تلفات علاوه بر اینکه با کنترل منفی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار دارند با بتاااگزوتوکسین خالص نیز اختلاف معنی‌دار داشته و در گروه B قرار گرفته‌اند و مشکوک به دارا بودن اگزوتوکسین می‌باشند. بقیه جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشته و در گروه C قرار گرفتند (جدول ۲).

داده‌های حاصل از غلظت 30x نشان دهنده آنست که با اطمینان ۹۹ درصد بین تیمارها از نظر درصد تلفات لارو کرم غوزه پنبه اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در اینجا نیز بتاااگزوتوکسین ۱۰۰ درصد تلفات داشته و در گروه A قرار دارد. جدایه‌های شماره ۹، ۵، ۳ و ۲ به ترتیب با ۷۷/۷۰، ۳۷/۸۰، ۳۵/۵۰ و ۲۸/۹۰ درصد تلفات با بتاااگزوتوکسین خالص اختلاف معنی‌دار داشته و با شاهد منفی نیز اختلاف معنی‌دار دارند و در گروه‌های B و C قرار دارند. بقیه جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشته و در گروه D قرار گرفته‌اند و تلفاتی در کرم غوزه پنبه ایجاد نکرده‌اند (جدول ۳).

در مجموع مقایسه میانگین داده‌ها حاصل از آزمایش با غلظت 1x و 30x نشانگر این است که در سوپرناتانت جدایه‌های شماره ۹، ۵، ۳ و ۲ عامل کشنده‌ای وجود دارد که می‌تواند اگزوتوکسین باشد و باتوجه به درصد تلفات در دو غلظت 1x و 30x مشخص می‌گردد که مقدار آن در دو غلظت مورد اشاره متفاوت است.

برای تکمیل نتایج روش زیست‌سنجی و تایید جدایه‌های مشکوک به دارا بودن بتاااگزوتوکسین از روش HPLC استفاده گردید. مقایسه نتایج بدست آمده از زیست‌سنجی و تجزیه و اندازه‌گیری بتاااگزوتوکسین به روش کروماتوگرافی نیز نشان میدهد که جدایه‌های ۹، ۵، ۳ و ۲ دارای بتاااگزوتوکسین هستند (جدول ۴).



شکل ۱: پیک بتااگزوتوکسین در کروماتوگرافی HPLC

جدول ۲- گروه‌بندی میانگین درصد تلفات لاروهای چهارروزه کرم غوزه پنبه در اثر غلظت 1x سوپرناتانت جدایه‌های بومی .Bt با استفاده از روش دانکن.

تیمارها (جدایه‌ها)	کد جدایه	میانگین درصد تلفات (X ± SEM)	گروه
۱۳	Exotoxin	۱۰۰ ± ۰/۰۲	A
۹	3R	۲۴/۴۰ ± ۰/۰۲	B
۵	4t	۲۴/۴۰ ± ۰/۰۲	B
۳	Kn4	۱۵/۵ ± ۰/۰۲	B
۲	Krm23	۴/۴ ± ۰/۰۲	C
۱۴	C (کنترل)	۲/۲ ± ۰/۰۲	C
۱۰	2t	۲/۲ ± ۰/۰۲	C
۶	6R	۲/۲ ± ۰/۰۲	C
۱۲	Dh11	۲/۲ ± ۰/۰۲	C
۸	11C	۰/۰۰	C
۱	Krm	۰/۰۰	C
۱۱	Crp19	۰/۰۰	C
۴	E4	۰/۰۰	C
۷	5R	۰/۰۰	C

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۳- گروه‌بندی میانگین درصد تلفات لاروهای چهارروزه کرم غوزه پنبه در اثر غلظت 30x سوپرناتانت جدایه‌های بومی .Bt با استفاده از روش دانکن.

تیمارها (جدایه‌ها)	کد جدایه	میانگین درصد تلفات (X ± SEM)	گروه
۱۳	Exotoxin	۱۰۰ ± ۰/۰۳	A
۹	3R	۷۷/۷۰ ± ۰/۰۳	B
۵	4t	۳۷/۸۰ ± ۰/۰۳	C
۳	Kn4	۳۵/۵۰ ± ۰/۰۳	C
۲	Krm23	۲۸/۹۰ ± ۰/۰۳	C
۱۴	C	۲/۲ ± ۰/۰۳	D
۱۰	2t	۲/۲ ± ۰/۰۳	D
۱	Krm	۰/۰۰	D
۸	11C	۰/۰۰	D
۴	E4	۰/۰۰	D
۱۱	Crp19	۰/۰۰	D
۱۲	Dh11	۰/۰۰	D
۶	6R	۰/۰۰	D
۷	5R	۰/۰۰	D

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۴- مقایسه نتایج زیست‌سنجی و اندازه‌گیری بتااگزوتوکسین به روش HPLC سوپرناتنت جدایه‌های .Bt روی کرم غوزه پنبه.

جدایه‌ها	کد	زیست سنجی	HPLC (µg/ml)
۱	Krm 4	–	–
۲	Krm 23	+	۷/۳۷
۳	Kn 4	+	۳۱/۸۰
۴	E 4	–	–
۵	4 t	+	۱۲۵/۶
۶	6 R	–	–
۷	5 R	–	–
۸	11 C	–	–
۹	3 R	+	۲۹۴/۵
۱۰	2 t	–	–
۱۱	Crp 19	–	–
۱۲	Dh 11	–	–

بحث

بتا اگزوتوکسین از نظر سمیت دارای طیف وسیعتری نسبت به کریستال توکسین می‌باشد و طبق قوانین ثبت آفت‌کشهای میکروبی، فرآورده‌های بیولوژیک براساس ماده موثره .Bt باید فاقد بتا اگزوتوکسین باشند. بنابراین ارزیابی بتا اگزوتوکسین در جدایه‌های بومی .Bt عامل مهمی در انتخاب آنها محسوب می‌گردد. لذا در ارزیابی‌ها میزان تولید این سم توسط جدایه مدنظر قرار گرفته و با استفاده از شیوه‌های رایج در مسیر تولید ردیابی می‌شود. یکی از روش‌هایی که برای ردیابی استفاده می‌گردد روش زیست‌سنجی و روش دیگر HPLC می‌باشد. آزمایشگاه‌های متعددی استفاده از روش HPLC را برای ردیابی و اندازه‌گیری کمیت آن بجای زیست‌سنجی که وقت‌گیر است پیشنهاد داده‌اند.

بررسی لوینسون و همکاران (۸) روی نتایج بدست آمده از HPLC و روش زیست‌سنجی نشان داد که HPLC می‌تواند برای ردیابی بتا اگزوتوکسین تولید شده توسط استرینهای مختلف بکار رود. تحقیقات ما نیز مشخص کرد که HPLC می‌تواند برای ردیابی بتا اگزوتوکسین در استرینهای مختلف .Bt استفاده شود زیرا جدایه‌هایی که در قسمت زیست‌سنجی مشکوک به دارا بودن بتا اگزوتوکسین بودند در روش HPLC نقطه اوج مشخص اگزوتوکسین را نشان دادند. همچنین محاسبه مقدار بتااگزوتوکسین در جدایه‌های مختلف نیز نشان داد که مقدار بتااگزوتوکسین در استرینهای مختلف متفاوت است. ضمناً همه استرینهای .Bt بتااگزوتوکسین تولید نکردند و براساس نتایج روش HPLC تنها جدایه‌های Krm23، Kn4، 4t و 3R دارای این توکسین بودند. بررسی نتایج زیست‌سنجی نیز وجود آنها را تایید کرد. تفاوت موجود در تلفات ایجاد شده در دو غلظت 1x و 30x سوپرناتانت مربوط به مقدار بتااگزوتوکسین موجود در این دو غلظت می‌باشد. بهرحال مرگ و میر کرم غوزه پنبه در اثر مخلوط جدا نشده دلتا اندوتوکسین و اگزوتوکسین، ناشی از اثر توام، سینرژیستی یا آنتاگونیستی این توکسین‌ها روی یکدیگر می‌باشد. همچنین ممکن است جدایه‌ای روی دو راسته دیگر حشرات یعنی دوبالان و سخت بالپوشان موثر باشد. گاردنر و همکاران (۴) یک دز .Bt را با ۵ دز مختلف بتا اگزوتوکسین روی *Spodoptera frugiperda* آزمایش کردند و بر اساس طول زمان مصرف غلظتهای مختلف بتااگزوتوکسین پاسخهای متفاوتی از آنتاگونیسم تا سینرژیسم بدست آوردند. در این مطالعات ترکیب دزهای پایین .Bt و بتااگزوتوکسین اثر سینرژیستی ایجاد نکرد. ولی وقتی دز پایینی از بتا اگزوتوکسین که کمتر از ۱۰ درصد مرگ و میر ایجاد می‌کرد با دزی از .Bt که مرگ و میر بالای ۶۰ درصد به وجود می‌آورد ترکیب شد اثر سینرژیستی داشت و مرگ و میر صددرصد ایجاد نمود.

لوینسون و همکاران (۸) در مطالعاتشان دو تیپ بتااگزوتوکسین جدا کردند و آنها را تیپ I و II بتااگزوتوکسین نامیدند که از نظر سمیت با یکدیگر اختلاف داشتند. دلمج (۳) نیز این فرضیه را که همه بتااگزوتوکسین‌ها مثل هم نیستند تایید کرد و احتمال وجود سه نوع مختلف بتااگزوتوکسین توسط استرینهای مختلف .Bt زیر گونه تورینژینسیس براساس طیف میزبانی بر علیه راسته بالپولکداران و دوبالان مطرح نمود. بنابراین علت تفاوت موجود در تلفات لاروی

ایجاد شده در غلظتهای 1x و 30x سوپرناتانت جدایه‌های بومی .Bt و بتااگزوتوکسین استاندارد می‌تواند یکی به خاطر تفاوت غلظت این ترکیب بین جدایه‌ها و نمونه خالص و یا به علت ماهیت بتااگزوتوکسین موجود در آنها باشد که از نظر سمیت با یکدیگر تفاوت دارند.

سپاسگزاری

ضمن تشکر از دکتر Jef Charles برای ارسال بتااگزوتوکسین استاندارد و آقای مهندس رسول مرزبان برای ۵ نمونه جداشده از غرب ایران، از بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه‌ی تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی به خاطر تامین جدایه‌ها، مواد، امکانات و ارتباط با انستیتوپاستور فرانسه سپاسگزاری می‌شود.

References

1- Anwar Hosain, M., S. Ahmad and S. Haque. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. J. Invert. Pathol. 70: 221-225.

2- Carlberg, G., L. Tichanen and A. H. Hammed. 1995. Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparation, including thuringiensis, using the *salmonella* assay. J. of Invert. Pathol. 66: 68-71.

3- Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of Bt. and their potential for pest control. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases ed: (H. D. Burges,), Academic Press, pp: 193-222.

4- Gardner, W. A., Pendley, A. F. and G. K. Story. 1986. Interaction between *Bacillus thuringiensis* and its, beta-exotoxin in fall armyworm neonate larvae. Fla. Ent. 69:536-539.

5- Haufler, M. and S. Kunz. 1985. Laboratory evaluation of an exotoxin from Bt. sub sp. Morrisoni to horn fly larvae mice. J. of Econ Entomol. 7(3): 613-615.

6- Herbert, D. A. and J. D. Harper. 1986. Bioassay of B-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). J. Econ. Entomol. 79: 592-595.

7- Johnson. C., A. H. Bishop and C. L. Turner. 1998. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflews (Diptera: Calliphoridae). J. oF. Invert. Pathol. 71: 138-144.

8- Levinson, B. L., K. J. Kasyan., S. Chius and T., C. Currier. 1990. Identification of B-exotoxin production, plasmids encoding B-exotoxin and a new exotoxin in Bt. by using high Performance Liquid Chromatography. J. of Bacteriology. 172(6): 3172-3149.

9- Ohba, M., A. Tantichodock and K. Aizawa. 1981. Production of heat stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. J. Invert Pathol. 38: 26-32.

10- Ohba, M. and K. Aizawa. 1986. Distribution of Bt. in soils of Japan. J. Invert. Pathol. 47: 277-282.

11- Perani, M., A. H. Bishop and A. Vaid. 1998. Prevalence of β-exotoxin, diarhoeal toxin and specific β-exotoxin in natural isolates of Bt., Microbiol: letters. 160: 55-60.

12- Sabesta, K. J. Garkas, K. Horska and J. Vankora. 1981. Thuringiensis, the beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial control of pest and plant diseases. (ed. H. D. Burgess). Academic Press, London, PP. 249-281.

Journal of Entomological Society of Iran. 23 (1), 2003

Determination of β-exotoxin in Iranian Isolates of *Bacillus thuringiensis*

S. Izadyar[1], Kh. Talebi – Jahromi[2], H. Askary[3] and M. Rezapanah[1]

Abstract

Twelve Iranian isolates of *B. thuringiensis* were evaluated for β-exotoxin using combination of bioassay and HPLC methods. Bioassay results on 4 days old larvae of *Helicoverpa armigera* showed the existence of a mortality factor, which can be β-exotoxin, in some autoclaved supernatant of isolates (with no spores and crystals). To verify these results, the β-exotoxin was measured in each isolate using HPLC method. The results indicated that the concentrated supernatant of isolates Krm23, Kn4, 3R and 4t contained β-exotoxin. Isolates Krm23 and 3R had the lowest (7.37 µg/ml) and highest (294.5 µg/ml) amounts of β-exotoxin, respectively. Comparison of bioassay results with β-exotoxin analyzed by HPLC showed that measured quantities of β-exotoxin were confirmed by the mortality percentage of *Helicoverpa armigera*.

Key words: Iranian strains of *Bacillus thuringiensis*, β-exotoxin, *Helicoverpa armigera*, HPLC, Bioassay

1- Biological Control Res. Dept., Plant Pests and Diseases Research Institute, Tehran, P.O.Box 19395-1454

2- College of Agriculture, Tehran University, Karaj.

3- Research Institute of Forest and Rangeland, Alborz Research Center, Tehran, P.O.Box 13185-116