مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۲، شماره۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶(شماره پی در پی۱۲۱)

بررسی وجود ژن cry در باسیلوس ترینجینسیس های جدا شده از خاک

رضا محمودی[۱]، غلامرضا ایراجیان[۲]، ایرج جوادی[۱]، اسماعیل پناهی کوخدان[۳]

[۱]گروه سم شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، شهرضا، ایران، [۲]گروه میکروب شناسی، دانشگاه ایران، تهران، ایران، [۳]گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۵

چکیده

زمینه و هدف: باسیلوس ترینجینسیس باکتری گرم مثبت و اسپورزا است. اصلی‌ترین زیستگاه این باکتری خاک بوده و توانایی تولید انواع متنوعی از پروتئین‌های کریستالی با خاصیت حشره‌کشی را داراست. هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باسیلوس ترینجینسیس حمل کننده ژن Cry از خاک های نقاط مختلف استان تهران با استفاده از روش Multiplex-PCR بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ـ تحلیلی مقدار ۲۰۰ گرم خاک از عمق ۱۰ سانتی متری به طور تصادفی و در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد. سپس بر اساس پروتوکل تأیید شده به وسیلهWHO، کلنی‌های مشکوک به باسیلوس تورنجینسیس جداسازی و ایزوله ها از نظر تست های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی تأیید شدند. پس از استخراج DNA از تمامی‌سویه‌ها، با استفاده از 16S rDNA PCR Sequencing باسیلوس ترینجینسیس بودن سویه‌های حاوی ژن Cry تأیید شد، داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در نمونه‌های خاک مورد بررسی، ۴۱ سویه باسیلوس تورینجنسیس شناسایی شد. نتایج MPCR نشان داد که از ۱۴ سویه حامل توکسین کریستالی، ۷ سویه (۵۰ درصد) به تنهایی واجد ژن cry1، ۴ سویه (۲۸/۵درصد) به تنهایی واجد ژن cry2 و ۳ سویه (۲۱/۵ درصد) به تنهایی واجد ژن cry3 بودند و باندهای مربوطه را نشان دادند. ژنcry4 و cry5 در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها (صفردرصد) مشاهده کن.

نتیجه گیری: با توجه به تنوع بسیار زیاد ژن پروتئین کریستالی و عدم وجود روش‌های فنوتیپی دقیق در شناسایی حضور پروتئین کریستالی، بنابراین تشخیص همزمان این ژن‌ها می‌تواند با هزینه اندک و سرعت‌العمل زیاد باسیلوس‌های حاوی ژن کریستالی را شناسایی نماید.

واژهای کلیدی: باسیلوس تورینجنسیس، ژن‌های cry، Multiplex-PCR.

*نویسنده مسئول: ایرج جوادی، شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرضا، گروه سم شناسی

Email: irjava@yahoo.com

مقدمه

از سال ۱۹۰۱ که ایشی واتا باکتری شناس ژاپنی، از بدن یک لارو مرده کرم ابریشم باکتری باسیلوس ترینجینسیس را جدا کرد، تا کنون قریب به یک قرن است که مطالعه‌های گسترده‌ای در زمینه تأثیرات و نحوه عملکرد و اثر این باکتری انجام می‌گیرد. در سال ۱۹۱۱ برلینر نیز در ناحیه تورجنیای آلمان باکتری مشابهی از پروانه آرد گندم جدا و آن را باسیلوس تورنجنسیس نام‌گذاری کرد. این باکتری کاملاً اختصاصی عمل کرده و در حشرات مفید و انسان و سایر مهره داران بیماری ایجاد نمی‌نماید(۱).

این باکتری، باسیل گرم مثبت و اسپورداری است که قادر است علیه آفات کشاورزی همانند یک توکسین عمل کرده و در کنترل بیولوژیک آفات مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲). کنترل طبیعی و مبارزه بیولوژیک روش جایگزینی است که در کاهش و یا حتی قطع استعمال ترکیب‌های شیمیایی در کشاورزی نقش دارد. کنترل بیولوژیکی آفات کشاورزی در طول ده سال گذشته با توجه بیشتری دنبال شده است. باسیلوس تورنجینسیس یک باکتری غیر بیماری‌زا در انسان است که عنصر فعال کننده برخی حشره‌کش‌ها را تشکیل می‌دهد(۵ـ۳). پس از آلوده شدن سیستم گوارشی لارو حشره به این باکتری، پروتئین‌های کریستالی در روده لارو حشره حل می‌شوند و تحت اثر با آنزیم‌های پروتئولیتیک به یک جزء توکسین تبدیل می‌شوند. سلول‌های اپیتلیال روده حشره به سرعت متورم شده و تخریب می‌شوند(۹ـ۶).

این باکتری با تولید کریستال‌های پروتئینی درون هاگ‌های بنام ICP (Internal crystal protein)، گاما ـ اندوتوکسین و یا پروتئین‌های کریستالی برای انواعی از لاروهای حشرات سمی می‌باشد(۱۰). دو نوع گاما اندو توکسین وجود دارد؛ نوع cry که عملکرد کاملاً اختصاصی دارد و نوع cyt که به رسپتورهای اختصاصی نیاز ندارد(۱۱).

گاما اندوتوکسین Cry با گیرنده‌های اختصاصی که بر روی سطح سلول‌های اپیتیال روده حشره قرار دارد، برهمکنش می‌دهند و به وسیله پروتئازهای میزبانی پس از اتصال به گیرنده اختصاصی فعال می‌شوند و منجر به تشکیل ساختارهای الیگومریک می‌شود(۱۳ و۱۲). در مقابل، توکسین‌های Cyt به طور مستقیم با لیپیدهای غشایی برهمکنش داده و به درون غشاء وارد می‌شود. پروتوکسین‌های Cry و Cyt امروزه شامل ۳۲ مجموعه (Cyt2 و Cry1, Cyt1 تا Cry67) می‌باشد(۱۴).

باکتری منجر به فلج سیستم گوارشی لارو حشره شده و در نهایت لارو را از تغذیه باز می‌دارد و حتی اگر لارو سریعا کشته نشود، عدم تغذیه لارو منجر به کاهش خسارات وارده از لارو به محصولات کشاورزی می‌شود(۱۵).

در دهه‌های اخیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR به طور گسترده‌ای به منظور بررسی محتوای ژنی cry (DNA) در سویه‌های جمع‌آوری شده باسیلوس ترینجینسیس به کار گرفته می‌شود. شناسایی ژن‌های کریستالی این باکتری بر اساس PCR اولین بار به

وسیله پرز و همکاران انجام شد(۱۶). استفاده از پروتئین‌های کریستالی باسیلوس تورینجنسیس روش جایگزین ارزشمند در استفاده از حشره کش‌های معمولی است. فعالیت بالا و بی‌ضرر بودن در محیط پیرامون شان، ایمنی کامل برای انسان و سایر پستانداران و هم‌چنین سازگاری با دیگر ترکیب‌های کنترل کننده مثل حشره‌کش‌ها از مزایای آن است و هزینه بالای تولید به صورت درون تنی، عملکرد نسبتاً آهسته، عدم تأثیر بر حشرات بالغ که معمولاً بیشترین آسیب را وارد می‌کنند، از معایب آن می‌باشد. به دلیل این که سموم شیمیایی بعضاً دارای اثرات کارسینوژن برای انسان‌ها می‌باشند، ولی سم تورینجنسیس دارای مزایای از جمله دامنه میزبانی باریک و عدم تأثیر بر روی حشرات مفید، ایمنی کامل برای انسان و سایر پستانداران، سازگاری با دیگر ترکیب های کنترل کننده مثل حشره‌کش‌ها و یا نماتودهای پاتوژن حشرات و در نتیجه بقا در نتیجه کنترل مداوم می‌باشد.

به دلیل این که باکتری‌هایی باسیلوس تورینجنسیس دارای ژن‌های کریستالی(cry) می‌باشند. قادر به تولید توکسین مورد نظر می‌باشند و این که کدام ژن کریستالی فراوانی بیشتری در محیط دارد.

با توجه به تنوع بسیار زیاد ژن پروتئین کریستالی و عدم وجود روش‌های فنوتیپی دقیق در شناسایی حضور پروتئین کریستالی، بنابراین تشخیص هم زمان این ژن‌ها می‌تواند با هزینه اندک و سرعت‌العمل زیاد باسیلوس‌های حاوی ژن کریستالی را شناسایی کند.

هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باسیلوس ترینجینسیس حمل کننده ژن Cryجدید از خاک استان تهران بوده است که می‌تواند به عنوان عامل کنترل بیولوژیک و جایگزین حشره کش‌ها و سموم شیمیایی مورد استفاده در مصارف کشاورزی باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی برای جداسازی باسیلوس تورنجینسیس از خاک، ۲۰۰ گرم خاک از عمق ۱۰ سانتی‌متری به صورت تصادفی از مناطق مختلف تهران (در مجموع ۱۰۰ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند. سپس بر اساس پروتوکل تأیید شده به وسیله WHO، ۵ گرم از خاک را در فویل آلومینیومی در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت در آون خشک انکوبه شدند (بدین منظور باکتری‌های فاقد اسپور به وسیله تیمار حرارتی کشته شدند). سپس به ۱ گرم از نمونه خاک ۱۰ میلی‌لیتر سرم نمکی (۸۵ درصد وزن بر حجم) اضافه نموده و ورتکس شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} از آن تهیه و ۱۰۰میکرو لیتر از هر نمونه بر روی محیط لوریا آگار کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های مشکوک به باسیلوس تورنجینسیس جداسازی و ایزوله ها از نظر

تست بیوشیمیایی و وجود ژن cry مورد بررسی قرار گرفتند

کلنی‌های رشد یافته مشکوک به باسیلوس تورنجینسیس از نظر آزمون‌های بیوشیمیایی مانند؛ رنگ‌آمیزی گرم و رنگ‌آمیزی اسپور به روش؛ شفر- بولتون، تخمیر قندهای مالتوز، گلوکز، فروکتوز، مانتیول، سوکروز، سالیسین و تست تجزیه نشاسته با استفاده از محیط نشاسته آگار(Starch Agar)، توانایی مصرف اسکولین با استفاده از محیط بایل اسکولین ساخت شرکت مرک کشور آلمان و تهیه شده در پلیت یا در لوله به صورت شیب‌دار، توانایی مصرف سیترات با استفاده از محیط کشت سیمون سیترات ساخته شده به وسیله شرکت مرک آلمان و تولید آنزیم‌های اوره آز، همولیزین، کاتالاز و تحرک باکتری‌ها با استفاده از محیط نیمه جامد SIM (ساخت کمپانی مرک، آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند. از سویه استاندارد باسیلوس تورنجینسیس با شماره NCIMB9134 به عنوان کنترل مثبت در تمامی مراحل کار استفاده شد.

پس از انتخاب پرایمر مناسب، و توالی در NCBI بلاست(BLAST) و به شرکت سیناژن ایران، سفارش داده شد(جدول۱). پس از استخراج DNA با استفاده از روش فنل ـ کلرفرم(استخراجی که معمولاً رسوب با اتانول انجام می‌شود، روشی معمول برای حذف پروتئین از نمونه‌های DNA است. در این روش محلول DNA با فنول و کلروفورم ترکیب می‌شود، DNA محلول در آب در فاز آبی می‌ماند، در حالی که پروتئین‌ها به وسیله محلول‌های آلی دناتوره می‌شوند و در فاز آلی قرار می‌گیرند. فاز مایع که حاوی DNA بدون پروتئین است می‌تواند جمع‌آوری شود) مراحل PCR برای شناسایی سویه های حامل ژن‌های cry1، cry2، cry3 ، cry4 و cry5 انجام شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن Cry با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ژنوم باکتری باسیلوس تورنجینسیس انجام شد. برای انجام این واکنش، ابتدا یک مخلوط واکنش دارای ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲۵ میلی مولار $dNTP_s$ و بافر PCR تهیه شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با مخلوط واکنش فوق به همراه دو واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۲۰۰ نانوگرم از ژنوم باکتری باسیلوس تورنجینسیس از هر نمونه انجام شد. شرایط واکنش PCR برای تکثیر ژن مورد نظر عبارت است از؛ یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر DNA با شرایط واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. هم‌چنین محصول تکثیری برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد(۱۷).

پس از اتمام واکنش تکثیر ۵ میکرولیتر از محصول واکنش به همراه ۲ میکرولیتر از بافر لودینگ برروی ژل آگارز یک درصد تحت تأثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

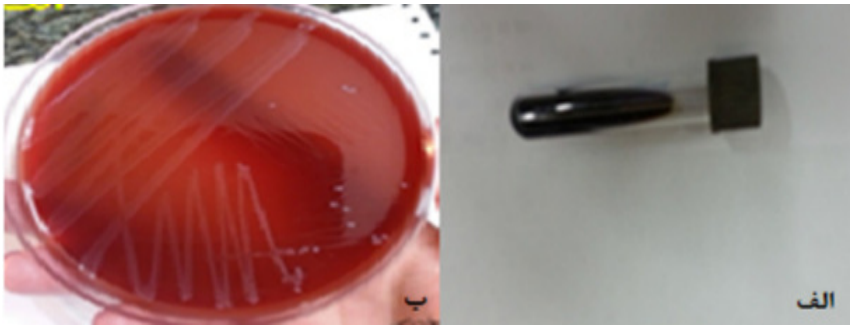
ژن	توالی نوکلئوتیدی ۳→۵	طول قطعه تکثیر شده	دمای آنالینگ
cry1	F: TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA R: TATCGGTTTCTGGGAAGTA	۲۷۲	۴۸
cry2	F: TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT R: AACTCCATCGTTATTTGTAG	۵۵۶	۴۵
cry3	F: TTAACCGTTTTCGCAGAGA R: TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	۶۵۲	۴۸
cry4	F: GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC R: GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	۴۳۹	۶۰
cry5	F: TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA R: AAGACCAAATTCAATACCAGGG	۴۷۴	۵۰

یافته‌ها

در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهر تهران، چهل و یک (۴۱ درصد) جدایه باسیلوس تورینجنسیس با استفاده از تست‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر، رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، کاتالاز، تست اوره‌آز، بررسی حرکت و تست مصرف سیترات و ژلاتیناز به دست آمد(تصویر۱).

در تمام موارد سویه‌های جدا شده در تولید کاتالاز و همولیزین توانایی بارزی داشتند. سویه‌های جداسازی شده از نظر حرکت و تخمیر قندهای سالیسین و لاکتوز متغیر بودند، اما تمامی سویه‌ها از نظر تولید آنزیم لسیتیناز و هیدرولیز نشاسته و اسکولین مثبت و تست اوره آز منفی داشتند. اکثر سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز، مالتوز و فروکتوز را داشته و تولید اسید می‌نمودند. هیچ کدام از سویه‌های جداسازی شده توانایی تخمیر مانیتول و استفاده از سیترات را نداشتند. نمونه‌های جداسازی شده بر اساس ۴ آزمون تخمیری در چهار سروتیپ قرار داشتند که در این میان کمترین سروتیپ متعلق به سوتو(Sotto) و بیشترین تعداد متعلق به سروتیپ کورستاکی(Kurstaki) بود.

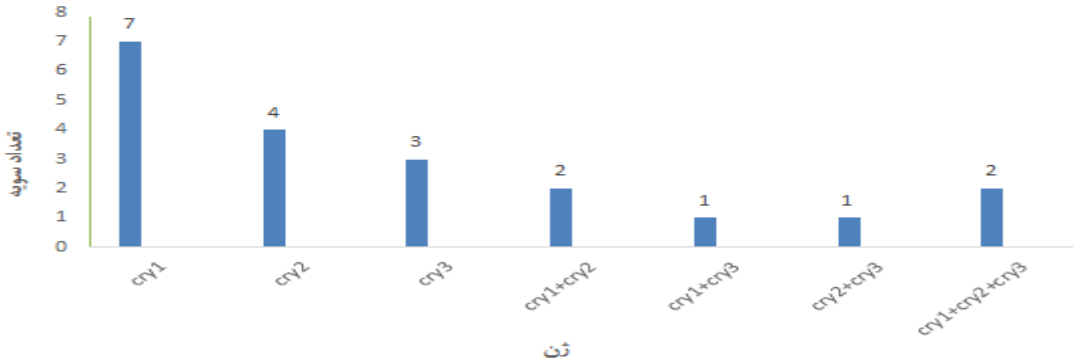
نتایج مولکولی نشان داد که از ۱۴ سویه حامل توکسین کریستالی، ۷ سویه(۵۰ درصد) واجد ژن cry1، ۴ سویه(۲۸/۵ درصد) واجد ژن cry2 و ۳ سویه (۲۱/۵ درصد) واجد ژن cry3 می‌باشند و باندهای مربوطه را نشان دادند. ژنcry4 و cry5 در هیچکدام از ایزوله‌ها (۰ درصد) مشاهده نشد. نمودار۱ فراوانی ژن‌های کریستالی را در ایزوله های تحت بررسی نشان می‌دهد.



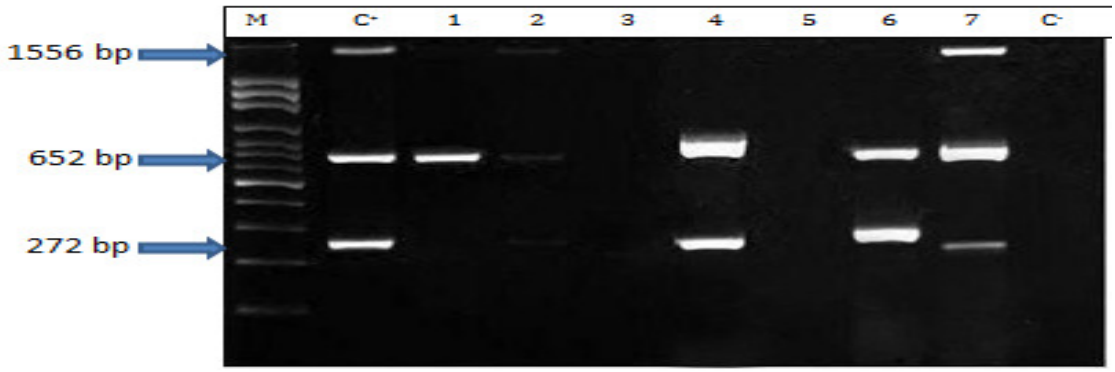
تصویر ۱.الف) محیط کشت بایل اسکولین آگار ب) محیط کشت بلاد آگار

سروتیپ	آسکولین	سالیسین	لسیتیناز	سوکروز	تعداد سروتیپ ها(درصد)
ترنجنسیس[۱]	+	+	+	+	۳(۲۱/۴)
کورستاکی[۲](Dipel)	+	+	+	-	۶(۴۲/۸)
آیزاوای[۳](Xentari)	+	+	-	-	۴(۲۸/۵)
سوتو[۴]	+	-	+	-	۱(۷/۵)

جدول۲: سروتیپ های حاصل از باسیلوس تورینجنسیس



نمودار۱: فراوانی ژن‌های کریستالی مورد مطالعه در ایزوله‌های باسیلوس تورینجنسیس



تصویر۱: الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ باند ۲۷۲ برای ژن cry1، باند ۱۵۵۶ مربوط به تکثیر ژن cry2 و باند 652 مربوط به ژن cry3 می‌باشد. M بیانگر DNA ladder (۱۰۰bp)(فرمنتاز)، +C؛ کنترل مثبت (باسیلوس تورنجینسیسNCIMB 9134) و -C؛ کنترل منفی (Bacillus subtilis subsp. subtilis ATCC 6051) می‌باشد.

بحث

باسیلوس ترینجینسیس باکتری گرم مثبت و اسپورزا است. اصلی‌ترین زیستگاه این باکتری خاک بوده و توانایی تولید انواع متنوعی از پروتئین‌های کریستالی با خاصیت حشره‌کشی را داراست. هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باسیلوس ترینجینسیس حمل کننده ژن Cryجدید از خاک استان تهران بوده است که می‌تواند به عنوان عامل کنترل بیولوژیک و جایگزین حشره کش‌ها و سموم شیمیایی مورد استفاده در مصارف کشاورزی بود.

باسیلوس ترینجینسیس کنترل آفات و حشرات اهمیت زیادی دارد. که در تولید بیش از ۹۰ درصد آفت کش های میکروبی و تعداد زیادی از گیاهان تراریخته مقاوم به حشرات به عنوان عاملی برای مبارزات بیولوژیک کاربرد دارد. این باکتری نوعی باسیل گرم مثبت و اسپورداری است که قادر است علیه آفات کشاورزی همانند یک توکسین عمل نموده و در کنترل بیولوژیک آفات مورد استفاده قرار گیرد(۲۱ـ۱۸).

در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه خاک مورد بررسی ۴۱ سویه(۴۱ درصد) باسیلوس تورینجنسیس به دست آمد که با استفاده از تست‌های روتین و روزمره بیوشیمیایی در ۴ سرگروه تورینجنسیس، کورستاکی، سوتو و آیزاوایی قرار گرفتند. ژن cry در ۱۴ سویه (۳۴/۱ درصد)از سرگروه‌های تحت مطالعه شناسایی شد که بیشترین و کمترین شیوع ژن‌های کریستالین در ایزوله‌ها به ترتیب مربوط بود به cry1 (۷ سویه، ۵۰ درصد) و cry3 (۳ سویه، ۲۱/۵ درصد)، همچنین(۲سویه ۱۴/۳ درصد)وجود همزمان ژن‌های cry1، cry2 و cry3 را نشان دادند. از ۴۱ سویه تحت بررسی هیچ‌کدام (۰ درصد)ژن‌های cry4 و cry5 را حمل نمی‌کردند.

این نتایج با مطالعه آسیک و همکاران در ترکیه همخوانی دارد. براوو و همکاران در مکزیک به ویژگی‌های ژن‌های cry در کلکسیون سویه‌های باسیلوس تورینجنسیس مکزیک پرداختند و دریافتند که از ۴۹۶ سویه باسیلوس تورینجنسیس ایزوله شده از ۵۰۳ نمونه خاک، سویه‌های دارای cry1 دارای بیشترین فراوانی را بودند(۴۹/۵ درصد) که با مطالعه فعلی همخوانی دارد. پروفایل مختلف از cry1 نشان داده شد. فراوانی ژن cry3 برابر ۲۱/۵ درصد بود که با مطالعه حاضر همخوانی دارد(۲۳ و۲۲).

ناظمی و همکاران در تنکابن (غرب مازندران) نشان دادند که پس از غربالگری خاک ۳۵ منطقه از غرب استان مازندران به روش انتخابی استات سدیم و L-Serine، تعداد ۱۲ سویه باسیلوس تورنجنسیس به دست آمد. پس از استخراج DNA از تمامی سویه‌ها، با استفاده از روش 16S rDNA Sequencing و روش‌های انتخابی ابتدا باسیلوس تورنجنسیس بودن مشخص شد. سپس سویه‌های حاوی ژن cry تأیید گردید. میان ۱۲ سویه جدا شده تنها در یک سویه ژن cry از کلاس 1Aa به طریق مولکولی شناسایی گردید که با مطالعه فعلی مغایرت دارد. این تضاد می‌توان در نتیجه شرایط جغرافیایی مختلف و تفاوت در نوع خاک و تأثیرات

اقلیم بر اکوسیستم باشد. این محققین دریافتند که؛ با توجه به تنوع بسیار زیاد ژن پروتئین کریستالی و عدم وجود روش‌های فنوتیپی دقیق در شناسایی حضور پروتئین کریستالی، استفاده از این روش Semi-conserve PCR می‌تواند با هزینه اندک و سرعت‌العمل زیاد باسیلوس‌های حاوی ژن کریستالی را شناسایی کند(۲۴).

سالک جلالی و همکاران در اهر (استان آذربایجان شرقی) دریافتند که ۴۷، ۲۹ و ۱۳ درصد از ۶۲ سویه به ترتیب حامل cry1، cry3 و cry4 بودند که نتایج برای cry1 و cry2 با مطالعه فعلی هم‌خوانی دارد، اما عدم وجود ژن cry4 در مطالعه پیش رو با مطالعه سالک جلالی می‌تواند در نتیجه تأثیر اقلیم بر اکوسیستم شود(۲۵).

نتیجه‌گیری

دستاورد این پژوهش، دستیابی به پرایمر جدیدی است که قادر به شناسایی ۴ ژن کریستالی به صورت هم‌زمان می‌باشد. احتمالاً وجود باسیلوس تورینجنسیس مولد توکسین کریستالی در خاک این مناطق می‌تواند بر رشد لاروها تأثیرگذار باشد و بنابراین می‌تواند در حاصل‌خیزی خاک مؤثر باشد. بهتر است با انجام مطالعه وسیع‌تر، بهترین خاک جهت تولید توکسین حشره‌کش انتخاب گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بر گرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته سم‌شناسی پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد شهرضا می‌باشد، بدین وسیله از مساعدت‌های که دانشگاه و حوزه معاونت پژوهشی جهت انجام این تحقیق به عمل آوردند ، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1.bizzarri M, Bishop A, Dinsdale A, Logan N. *Changes in the properties of bacillus thuringiensis after prolonged culture in a rich medium.* Journal of Applied Microbiology 2008 104(1): 60-9.

2.Thaphan P, Keawsompong S, Chanpaisaeng J. Chanpaisaeng, *isolation, toxicity and detection of cry gene in bacillus thuringiensis isolates in krabi province, thailand.* sonklanakarin Journal of Science and Technology 2008. 30(5): 597.

3.Bobrowski VL, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH, Fiuza LM. *detection of cry1 genes in bacillus thuringiensis isolates from south of brazil and activity against aanticarsia gemmatalis (lepidoptera: noctuidae).* Brazilian Journal of Microbiology 2001; 32(2): 105-9.

4.Bondzio A, Stumpff F, Schön J, Martens H, Einspanier R. I*mpact of bacillus thuringiensis toxin cry1ab on rumen epithelial cells (rec)–a new in vitro model for safety assessment of recombinant food compounds.* Food and Chemical Toxicology 2008; 46(6): 1976-84.

5.Keshavarzi M. *Isolation, identification and differentiation of local b. thuringiensis strains.* Journal of Agricultural Science and Technology 2010; 10: 493-9.

6.Xu D, Côté GC. *Sequence diversity of bacillus thuringiensis flagellin (h antigen) protein at the intra-h serotype level.* Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(17): 5524-32.

7.Bel Y, Granero F, Alberola TM, Martínez-Sebastián MJ, Ferré J. Distribution, frequency and diversity of Bacillus thuringiensis in olive tree environments in Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 1997; 2(4): 652-8.

8.Santana MA, Moccia-V CC, Gillis A. Bacillus thuringiensis improved isolation methodology from soil samples. *Journal of Microbiological Methods* 2008, 75(2):357-358.

9.Berón CM, Curatti L, Salerno GL. New strategy for identification of novel cry-type genes from Bacillus thuringiensis strains. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71(2): 761-5.

10. Bimboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 1979; 7(6):1513-23.

11. Xu D, Côté JC. Sequence diversity of Bacillus thuringiensis flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74(17): 5524-32.

12. Yamaguchi T, Sahara K, Bando H, Asano SI. Discovery of a novel Bacillus thuringiensis Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. *Journal of Invertebrate Pathology* 2008, 99(3): 257-262.

13.Berón cm, Curatti l, Salerno Gl. *new strategy for identification of novel cry-type genes from bacillus thuringiensis strains.* applied and environmental microbiology 2005; 71(2): 761-5.

14.bimboim h, doly j. *a rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna.* Nucleic Acids Research 1979; 7(6): 1513-23.

15.Sauka DH, Sánchez J, Bravo A, Benintende GB. T*oxicity of bacillus thuringiensis δ-endotoxins against bean shoot borer (epinotia aporema wals.) larvae, a major soybean pest in argentina.* Journal of Invertebrate Pathology 2007; 94(2): 125-9.

16.Juarez-perez V, Ferrandis M, Frutos R. *Pcr-based approach for detection of novel bacillus thuringiensis cry genes.* applied and environmental microbiology 1997; 63(8): 2997-3002.

17.Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum A, Hays JP. PCR primers. Springer 2008; 63-90.

18.Chatterjee S, Bhattacharya T, Dangar TK, Chandra G. *ecology and diversity of bacillus thuringiensis in soil environment* .African Journal of Biotechnology 2007; 6 (13): 1587-1591.

19.Travers RS, Martin PA, Reichelderfer CF. *selective process for efficient isolation of soil bacillus spp.* Applied and Environmental Microbiology 1987; 53(6): 1263-6.

20.Lee DW, Akao T, Yamashita S, Katayama H, Maeda M, Saitoh H, et al. *noninsecticidal parasporal proteins of a bacillus thuringiensis serovar shandongiensis isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic t cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 272(1): 218-23.

21.Aramideh S, Saferalizadeh MH, Pourmirza AA, Bari MR, Keshavarzi M, Mohseniazar M. *characterization and pathogenic evaluation of bacillus thuringiensis isolates from west azerbaijan province-iran.* african journal of microbiology research 2010; 4(12): 1224-9.

22.Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A,et al. *Characterization of cry genes in a mexican bacillus thuringiensis strain collection.* Applied and Environmental Microbiology 1998; 64(12): 4965-72.
23.Ozturk F, Acik L, Ayvaz A ,Bozdogan B, Suludere Z. I*solation and characterization of native bacillus thuringiensis strains from soil and testing the bioactivity of isolates against ephestia kuehniella zeller (lepidoptera: pyralidae) larvae.* Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi 2008; 33(4): 202-8.
24.Tohid F, Nazimi A, Jafarpour M. Isolation *and molecular identification of cry genes in bacillus thuringiensis isolates from soil of west mazandaran.* 2012.
25. Salekjalali M, Barzegari A, Jafari B. *Isolation, pcr detection and diversity of native bacillus thuringiensis strains collection isolated from diverse arasbaran natural ecosystems.* World Applied Sciences Journal 2012; 18(8): 1133-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Molecular Characterization of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soil

Mahmoudi R[1], Irajian GH[2], Javadi I[1], Panahi kokhdan E[3]

[1]Department of Toxicology, Shahreza Branch, Islamic Azad University, shahreza, Iran, [2]Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [3]Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 12 Aug 2016 Accepted: 25 Apr 2017

Abstract

Background & aim: *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram-positive and sporulating bacteria. The main habitat of the bacteria is soil and able to produce a wide variety of insecticidal crystal protein's with Insecticide properties. The aim of the study was to detection of *cry1, cry2, cry3, cry4* and *cry5* genes in the *B. thuringiensis* isolated from soil samples by Multiplex-PCR method.

Methods: In this cross-sectional study, 200 grams of soil sample randomly were collected from at 10 cm depth and totally 100 soil samples were taken from different areas of Tehran, Iran. According to the protocol approved by WHO, suspected colonies on *B. thuringiensis* isolated and strains were confirmed by the microbiological and biochemical tests. After DNA extraction Multiplex-PCR using specific primers in thermal cycler gradient the presence of cry genes were confirmed. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: Out of 100 soil samples studied, 41 strains were confirmed as *B. thuringiensis*. MPCR results showed that 14 strains carrying the crystalline toxin, 7 strains (50%) cry1, 4 strains (5.28%) cry2 and 3 strains (5.21%) cry3 genes. Cry4 and cry5 genes were not observed in any isolates (0.0%).

Conclusion: Based on great diversity of crystal protein genes and the absence of reliable phenotypic methods for detection of the presence of crystal proteins, simultaneous identification of these genes can be found as low cost and high speed response for identification of crystalline genes produced by *B. thuringiensis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cry genes, Multiplex-PCR.

***Corresponding author: Javadi I**, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Shahreza Branch, Shahreza,Iran
Email: irjava@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Mahmoudi R, Irajian GH, Javadi I, Panahi kokhdan E. The Molecular Characterization of cry genes in Bacillus thuringiensis Isolated from Soil. Armaghane-danesh 2017; 22 (2): 271-281.