مجله ایمنی زیستی
دوره ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

مروری بر باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) به‌عنوان آفت‌کش زیستی

مریم صادقی، اکرم صادقی*، ابراهیم کریمی
دانش آموخته کارشناسی ارشد مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کرج، ایران
***استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران**
مربی پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

به دلیل مخاطرات زیست محیطی آفت‌کش‌های شیمیایی، راهکارهای جایگزینی مانند عوامل کنترل زیستی برای برطرف کردن این مشکل ارائه شد است. یکی از این راهکارهای امیدبخش، استفاده از باکتری‌های حشره‌کش مانند *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) است. باکتری Bt طی مرحله اسپورزایی، کریستال‌های پروتئینی متشکل از گروه‌های مختلف سموم cry و cyt را ترشح می‌کند. پروتئین‌های Cry برای راسته‌های حشرات شامل Lepidoptera و Coleoptera، Hymenoptera، Diptera و همچنین نماتدها سمی است. سمیت شدید پروتئین‌های Cyt نیز بیشتر بر روی راسته Diptera گزارش شده است. از آن‌جا که هر نوع سم cry سازوکار مشخصی به عنوان حشره‌کش دارد، معمولا بر گونه‌های کمی از یک راسته ویژه تاثیر دارد. به تازگی، پژوهشگران پروتئین‌های آفت‌کش جدیدی (VIP) را که در فاز رشد رویشی باکتری Bt تولید می‌شوند و سازوکار عملکردی وسیع‌تری دارند، گزارش کرده‌اند. این سموم برای طیف وسیعی از راسته Lepidoptera کشنده است. باکتری Bt عوامل بیمارگر مختلفی شامل سموم پروتئینیترشحی حشره‌کش (اگزوتوکسین) نیز تولید می‌کند. ارتقاء عملکرد سویه‌ها، اجازه تولید محصولات جدید با استفاده از سویه‌های جدید که کارآمدتر از انواع قدیمی هستند را می‌دهد. هر چند هنوز پژوهش برای یافتن سویه‌های جدیدتر و بهتر ادامه دارد. گیاهان زراعی تراریخته که انواع cry و یا cyt را بیان می‌کنند تجاری شده‌اند.

کلمات کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، کریستال‌های پروتئینی، پروتئین‌های تراوشی VIP/SIP، گیاهان Bt

مقدمه

از روی برخی نشانه‌های تاریخی بر جای مانده، می‌توان پی برد که در مصر باستان از ویژگی حشره‌کشی اسپور باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) استفاده می‌شده است. در دوران مدرن، این باکتری توسط یک زیست‌شناس ژاپنی در ۱۹۰۱ به نام ایشی‌واتا شیگتان، هنگامی که بر روی لاروهای مرده کرم ابریشم در اثر بیماری مرگ سریع (sotto) پژوهش می‌کرد، کشف شد. این پژوهش‌گر نام باکتری جدا شده را *Bacillus sotto* برگزید. در سال ۱۹۱۵ باکتری مشابهی توسط یک پژوهشگر آلمانی به نام

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

ارنست برلینر (Ernst Berliner) از لاروهای بیمار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (*Anagasta* (*Ephestia*) *kuehniella*) در استان Thuringia آلمان جدا شد و *B. thuringiensis* نامیده شد. پس از آن برای آسانی کار، به این باکتری به اختصار Bt می‌گویند (۲۸).

باکتری Bt یکی از اعضا خانواده *Bacillaceae* و متعلق به گروه *Bacillus cereus* است. این گروه شامل *B. cereus*، *B. thuringiensis*، *B. anthracis*، *B. mycoides*، *B. pseudomycoides* و *B. weihenstephanensis* هستند. در این میان *B. thuringiensis* در سراسر دنیا یافت می‌شود و ۸۲ سروتیپ گوناگون از آن گزارش شده است (۲۸ و ۳۱). باکتری Bt گرم مثبت، هوازی و تولید کننده اسپور است. این باکتری را می‌توان در محیط‌های متفاوتی از جمله در خاک، اجساد حشرات، غلات ذخیره شده در انبار و روی سطح برگ‌ها پیدا کرد (۲۵). باکتری Bt نزدیک به گونه *Bacillus cereus* است. گاهی Bt توانایی تشکیل کریستال‌های پروتئینی را از دست می‌دهد که در این صورت از *B. cereus* قابل تشخیص نیست. در مقابل *B. cereus* نیز در صورت توانایی تولید کریستال‌های پروتئینی به Bt تبدیل می‌شود. پژوهش در زمینه سازو کار این تبدیل منجر به کشف این یافته شد که ژن‌های رمز کننده کریستال‌ها روی پلاسمید قرار دارند. کریستال‌های پروتئینیاز دو گروه با سازوکار حشره‌کشی متفاوت تشکیل شده‌اند. گروه اول کریستال‌های پروتئینی (crystal proteins) یا به طور اختصار پروتئین Cry و گروه دیگر با توانایی لیز سلولی (cytolytic) هستند که به اختصار به آن‌ها پروتئین Cyt می‌گویند. ژن‌هایی که پروتئین‌های Cry / Cyt را رمز می‌کنند، در طول اسپورزایی فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها توسط RNA پلی‌مراز ویژه‌ای کنترل می‌شوند که خود به‌طور ویژه در زمان تشکیل اسپور سنتز می‌شوند. تا بیست درصد محتوای پروتئینیاسپور از سم Cyt / Cry تشکیل شده است (۲).

ویژگی بارز باکتری Bt، توانایی آن در تولید کریستال‌های پروتئینیا δ–endotoxins در طول اسپورزایی است که در واقع یک ملکول پروتئین چند بخشی به شمار رفته و از سه ناحیه (domain) متفاوت تشکیل می‌شود. ناحیه یک از هفت آلفا هلیکس (α-helices) ساخته شده است. ناحیه دو از سه صفحه بتا (β sheets) موازی غیر هم‌جهت تشکیل شده که به صورت لوپ‌هایی تا خورده‌اند. ناحیه سه یک ساندویچ بتا است که از دو رشته بتای موازی غیر هم‌جهت ساخته شده است. مطالعات ملکولی روی خصوصیات ساختمانی و عملکردی δ-endotoxinهای مختلف نشان داد که ناحیه یک به دلیل خاصیت آمفی‌پاتیک و آب‌گریزیِ آلفا هلیکس‌ها می‌تواند از غشا عبور کند. این ویژگی‌ها ناحیه یک را قادر می‌سازد تا در غشا سلولی روده لاروها یک منفذ ایجاد کند. ناحیه دو بسیار متغییر است و همین ناحیه است که باعث اختصاصی شدن هر سم به حشره خاصی می‌شود. ناحیه سه دارای عملکردهای مختلفی مانند شرکت در پایداری ساختمانی، دریچه کانال یونی، اتصال به وزیکول‌های غشائی مژک‌ها است. اخیرا مطالعاتی روی تجمع و اثرات متقابل سم انجام گرفته است. این مطالعات نشان می‌دهد که این سه ناحیه، اثرات متقابل نزدیکی با هم دارند که مجموع آن‌ها باعث فعالیت حشره‌کشی Bt می‌شود (۳۸).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

ویژگی حشره‌کشی کریستال‌ها زمانی کشف شد که لارو مرده شب‌پره آرد در حالی که سرشار از اسپور و کریستال بود، پیدا شد. پژوهش‌ها نشان داد تماس مستقیم لارو سالم با اسپور یا کریستال‌ها اثر خاصی ندارد، در حالی‌که اگر سطح برگ‌ها را با اسپور و کریستال بپوشاندند، لاروها دست از غذا خوردن کشیده، سپس می‌میرند (۳٦). پس از به رسمیت شناختن پتانسیل Bt به عنوان حشره‌کش، برای مبارزه با کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis*) از Bt در مزرعه استفاده شد که این آزمایش نتایج امیدوار کننده‌ای در پی داشت (٤۳). این کار در پایان منجر به توسعه حشره‌کش تجاری Bt به نام اسپورین (Sporeine) شد که برای نخستین بار در سال ۱۹۳۸ در فرانسه مورد استفاده قرار گرفت. این حشره‌کش به‌طور اختصاصی روی پروانه‌سانان (lepidopteran) اثر دارد (۳٦).

در سال ۱۹۵۸ باکتری Bt برای نخستین بار و به صورت تجاری در ایالات متحده آمریکا تولید شد و در سال ۱۹٦۱ حشره‌کش‌های زیستی ساخته شده از Bt توسط سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا به ثبت رسید. علاوه بر این از سال ۱۹۹٦ تاکنون، محصولات تراریخته مقاوم به حشرات با نام محصولات Bt در سراسر جهان نیز گسترش یافته است. بررسی‌ها نشان می‌دهد بیش از پنجاه درصد پنبه و چهل درصد از ذرت کاشته شده در آمریکا از طریق مهندسی ژنتیک قادر به تولید سم حشره‌کش Bt هستند (۱۷). گسترش سطح زیر کشت محصولات Bt در کل دنیا این فرضیه را مطرح کرد که فشار انتخاب طبیعی بر آفات هدف افزایش یافته و ممکن است باعث افزایش خطر جهش و ایجاد آفات مقاوم به سم Bt شود. بدین‌معنی که افزایش در تکرار این جهش‌ها در جمعیت آفات، باعث کاهش کارآیی گیاهان تراریخته شده و یا حتی آن‌ها را بی‌تاثیر کند. در سال ۲۰۰۰ برای مقابله با خطر مقاومت آفات به Bt، استراتژی مدیریت مقاومت به‌طور ویژه برای گیاهان تراریخته معرفی شد. تخمین کارآیی واقعی این استراتژی مشکل است، اما بررسی‌ها نشان داد که تا سال ۲۰۰٦، شش سال پس از معرفی این دیدگاه، هیچ افزایشی در سطح مقاومت حشرات به محصولات Bt به وجود نیامده است (۳۷).

سموم زیستی حاوی پروتئین‌های کریستالی Bt، به دلیل اختصاصی بودن و بی‌خطر بودنشان برای محیط زیست، جایگزین‌های با ارزشی برای آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل حشرات آفت در کشاورزی، جنگل‌داری و حتی منزل هستند. پیشنهاد شده است که استفاده منطقی از سم Bt، گزینه‌های متنوعی را برای کنترل حشرات ایجاد خواهد کرد و راه‌حلی برای غلبه بر مشکل مقاومت حشرات به آفت‌کش‌های شیمیایی خواهد بود (۳٤).

زیست‌شناسی سم Bt

همان‌گونه که یاد شد آفت‌کش اسپورین، پروانه‌سانان را هدف قرار می‌دهد و در ابتدا تصور می‌شد که ماده موثره آن یک پاتوژن مهاجم غذازاد (food-borne) است. اما هنگامی که تزریق مستقیم کریستال‌ها در لارو حشره تاثیری نداشت این نظریه رد شد. آنالیز دستگاه گوارش لاروهایی که با غذای آلوده تغذیه شده بودند، اختلالی را در مژک‌های سلول‌های اپیتلیال روده نشان داد که در زمان کوتاهی پس از مصرف کریستال‌ها ایجاد شده بودند و به دنبال آن تورم و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

تجزیه سلول صورت می‌گرفت. محتویات روده لارو که حاوی اسپور باکتری نیز است، در حفره بدن رها می‌شود که نتیجه آن رشد و نمو باکتری در آن محل است. زمانی که مواد غذایی به پایان می‌رسد، باکتری تشکیل اسپور می‌دهد. این اسپورهای جدید که در جسد لارو و گیاه آلوده وجود دارند، در صورت تغذیه توسط میزبان جدید می‌توانند دوباره رشد کرده و این چرخه به همین صورت ادامه می‌یابد. این آزمایش‌های اولیه نشان داد که سم Bt در روده فعال می‌شود و به زودی کشف شد که عامل اصلی، محیط قلیایی و حضور یک پروتئاز ویژه است که یک پروتوکسین بی‌ضرر را از طریق بریدن یک قطعه به یک سم فعال تبدیل می‌کند. حال این سموم فعال شده هر کدام به گیرنده‌های موجود در غشا مژک‌ها متصل شده و باعث اخلال در حرکت املاح در سراسر اپی‌تلیوم روده و در نتیجه هجوم آب می‌شوند. آزمایش‌ها نشان دادند که ورود سم خالص Bt از راه دهان برای لارو کشنده است و پروتوکسین را می‌توان در آزمایشگاه به کمک پروتئاز ویژه و تحت شرایط قلیایی به فرم فعال تبدیل کرد. نیاز به محیط قلیایی، پروتئاز ویژه و گیرنده اختصاصی برای سم Bt به خوبی نشان می‌دهد که چرا این سم برای پستانداران که دارای روده اسیدی و فاقد گیرنده مربوطه هستند، نمی‌تواند آسیب‌رسان باشد (۳۶).

ساختار و ویژگی سم‌های Cry و Cyt در Bt

پژوهشگران بسیاری تلاش کرده‌اند تا با بهره‌گیری از معیارهای گوناگون مانند سروتایپینگ، حساسیت به فاژها و نقشه پلاسمید، یک سیستم طبقه‌بندی برای Bt معرفی کنند. این پژوهش‌ها منجر به طبقه‌بندی تقریبا صد زیرگونه از Bt شده است (۱۷). اگرچه همبستگی خوبی بین زیرگونه‌های Bt و دامنه میزبانی حشرات در سطح خانواده وجود دارد، این ارتباط تمایل دارد که در سطح جنس و گونه بشکند، به این دلیل که اکثر سویه‌های Bt می‌توانند بیش از یک نوع سم تولید کنند که نتیجه آن پیچیدگی و تداخل در پروفایل میزبان است. برای نمونه، بیشتر سویه‌های *Bt* subsp. *kurstaki* برای پروانه‌سانان (شب‌پره‌ها و بیدها) اختصاصی هستند. درحالی‌که سویه‌های *israelensis* برای دوبالان (مگس‌ها) و سویه‌های *morrisoni* برای قاب‌بالان (سوسک‌ها) اختصاصی‌اند. باقی سویه‌ها به هیچ‌وجه در مقابل حشرات فعال نیستند (۳٤)، اما برای برخی بی‌مهره‌گان سمی هستند. برای نمونه آن دسته از سویه‌های Bt که حاوی سموم نوع Cry5 و Cry6 هستند، در برابر نماتدها فعال‌اند (۳۵). طبقه‌بندی سویه‌های Bt در سطح جنس و گونه بهتر است بر اساس سم پروتئینیکه تولید می‌کنند، انجام شود. این روش همچنین راه منطقی‌تری برای تعریف دامنه میزبانی است. سموم Bt را می‌توان از نظر توالی اسید آمینه، ساختمان پروتئین و طریق عملکردشان شرح داد (۹).

سموم Cry با گیرنده‌های ویژه واقع بر روی سطح سلول‌های اپی‌تلیال روده واکنش می‌دهند و سپس با پروتئاز میزبان فعال شده و پس از اتصال به گیرنده باعث تشکیل یک ساختمان الیگومری پیش منفذی می‌شوند. در مقابل سم‌های Cyt مستقیما با لیپیدهای غشا واکنش داده و به آن می‌چسبند. پروتئین‌های Cyt همچنین در شرایط *in vitro* فعالیت سیتولیتیکی عمومی از خود به نمایش گذاشته و در شرایط *in vivo* غالبا فعالیت حشره‌کشی اختصاصی بر روی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

دوبالان (Diptera) بروز می‌دهد. هم اکنون کمیته نام‌گذاری، سم Bt پروتئین‌های Cry را در ۷۳ دسته (Cry1 تا Cry73) قرار داده است. پروتئین‌های Cyt نیز در ۳ خانواده گوناگون (Cyt1, Cyt2, Cyt3) دسته‌بندی شده‌اند (۲۹).

بر خلاف تنوع موجود در توالی پروتئین‌های Cry، همه آن‌ها یک ساختمان سوم مشابه را به اشتراک می‌گذارند. به عنوان نمونه تاکنون شش ساختمان به کمک کریستالوگرافی اشعه X تعیین شده است (Cry1Aa، Cry2Aa، Cry3Aa، Cry3Bb، Cry4Aa و Cry4Ba). بخش C ترمینال پروتئین در تشکیل کریستال شرکت می‌کند، اما جزئی از سم فعال نیست و در روده حشره جدا می‌شود. بخش N ترمینال به خودی خود سمی است و از سه ناحیه تشکیل شده است. ناحیه یک شامل یک بسته است که از هفت آلفا هلیکس تشکیل شده، شش تا از آن‌ها آمفی‌پاتیک (دارای یک سر آب‌دوست و یک سر آب‌گریز) هستند و توسط هفتمین هلیکس که آب‌گریز است در بر گرفته شده‌اند. این ناحیه مسئول پیوست به غشا و تشکیل حفره در آن است. ناحیه دو، شامل سه صفحه بتا موازی غیر هم‌جهت با لوپ‌های خارجی بوده و ناحیه سه، یک بتا ساندویچ است. نواحی یک و دو ویژگی اتصال به گیرنده را دارند که به تعریف دامنه میزبانی کمک می‌کند (٤).

مدل فعلی پیشنهاد می‌کند که ناحیه دو و سه در ابتدا به گیرنده‌های اولیه (cadherins) وصل می‌شوند که باعث جدا شدن ناحیه یک از پروتئین سم می‌شود. این کار الیگومریزه شدن را القا می‌کند که به نوبه خود باعث اتصال به گیرنده‌های ثانویه با تمایل بالا می‌شوند. در نهایت از طریق لنگرهای گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (glycosyl phosphatidyl inositol) موجود در C ترمینال به غشا متصل می‌شوند (٤٠). نیاز به الیگومریزه شدن از طریق ایجاد جهش در Cry1Ab مورد تایید قرار گرفته است (۳۳). یک مدل جایگزین پیشنهاد می‌کند که اتصال اولیه، یک آبشار پیام وابسته به Mg^{2+} را فعال می‌کند که باعث تجمع G پروتئین وابسته به cAMP می‌شود و پروتئین کیناز A را فعال می‌کند. آنالیز فیلوژنی تایید کرده که تنوع خانواده Cry توسط تکامل مستقل هر سه ناحیه به تنهایی و با مبادله ناحیه سه در میان سم‌ها ایجاد شده است (٤٦).

پروتئین‌های تراوشی (Secreted Toxins) و سایر توکسین‌ها

در فاز رویشی، برخی استرین‌های Bt دیده شده است که پروتئین‌هایی با ویژگی حشره‌کشی به محیط کشت تراوش پیدا می‌کنند. این موضوع زمینه افزایش گستره میزبانی این باکتری را فراهم می‌نماید. این پروتئین‌ها در دو دسته قرار داده شده‌اند: الف) vegetative insecticidal proteins: VIP ب) secreted insecticidal protein: Sip. پیش از این، پروتئین‌های VIP در ۳ خانواده (VIP1, VIP2, VIP3) قرار داشتند و به تازگی خانواده چهارمی نیز از سوی کمیته نامگذاری سم Bt تحت عنوان VIP4 وارد شده است. VIP1 و VIP2 با یکدیگر تشکیل سم جفتی (binary) با سمیت بالا در برابر آفات راسته Coleoptera و آفت مکنده شیره گیاهی به نام *Aphis gossypii* از راسته Hemiptera می‌دهند. پروتئین‌های VIP3 به صورت منفرد و نه جفتی، در برابر گستره بالایی از گونه‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

راسته Lepidoptera عمل می‌کنند. ویژگی‌های حشره‌کشی (فعالیت و گستره میزبانی) پروتئین VIP4 هنوز ناشناخته مانده. اگرچه از دید فیلوژنتیکی، با پروتئین‌های VIP1 نزدیکی بالاتری در مقایسه با VIP2 و VIP3 دارد. پروتئین دسته SIP تشکیل دهنده نخستین و تنها عضو خانواده پروتئین‌های تراوشی حشره‌کش Bt بوده و دارای سمیت در برابر لاروهای Coleoptera است. این پروتئین از سوپرناتانت کشت باکتری *Bt* strain EG2158 به دست آمد که دارای وزن مولکولی نزدیک به ٤١ کیلودالتون با ٣٦٧ اسیدآمینه است. این پروتئین برای *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) کشنده بوده و برای *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae) و *D. virgifera virgifera* سبب بازداری از رشد می‌شود. جدا از این گروه‌های پروتئینی که در بالا از آن‌ها یاد شد، باکتری Bt پروتئین‌های دیگری را نیز تولید می‌کند که بر پایه توالی و نواحی حفاظت شده آن‌ها، انتظار می‌رود دارای ویژگی سمیت باشند. اما بررسی اندکی روی آن‌ها شده است. همچنین برخی استرین‌ها، بتا-اگزوتوکسین غیرپروتئینی تولید می‌کنند که فعالیت با گستره بالا از خود بروز می‌دهند (٢٩).

توسعه و تکامل Bt به عنوان آفت‌کش

اگرچه سم تجاری اسپورین از سال ١٩٣٨ در فرانسه مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما تا سال ١٩٦١ در آمریکا به عنوان آفت‌کش به ثبت نرسیده بود (٣٤). در این زمان، دیگر محصولات Bt مانند توریسید (Thuricide) در بازار موجود بودند که از سویه *Bt.* subsp. *kurstaki* strain HD1 تشکیل شده و در برابر پروانه‌سانان فعال هستند. این محصولات اولیه از Bt با وجود ویژگی‌های سودمندانه‌ای که دارند، به دلیل عملکرد ضعیفشان نتوانستند به خوبی با آفت‌کش‌های شیمیایی به رقابت بپردازد (٢٠). برای غلبه بر این چالش، فعالیت‌های تجاری روی دو استراتژی متمرکز شدند: الف) بهبود و توسعه فرآیند تولید محصولات Bt ب) به‌سازی سویه جهت افزایش سمیت ذاتی باکتری بهبود در فرآیند تولید با اصلاح در روش‌های تخمیر و برداشت آغاز شد و مهم‌ترین جنبه آن فرمولاسیون سم بود. استفاده از سوسپانسیون مایع باکتری بسیار آسان است، اما جهت نگهداری مناسب نیست. چون به راحتی فاسد می‌شود، در حالی‌که حالت خشک و پودر شده آن برای نگهداری در دراز مدت و حمل و نقل مناسب‌تر است. این در حالی است که هزینه فرآیند خشک کردن بیشتر است و فرمولاسیون آن برای استفاده نهایی بسیار پیچیده است. در طول زمان و با پیشرفت علم مواد، اضافه کردن مواد جانبی مانند عوامل سوسپانسیون کننده برای جلوگیری از رسوب سوسپانسیون باکتری و اضافه کردن مواد نگهدارنده برای افزایش عمر مفید سوسپانسیون، مشکلات ناشی از کار با سوسپانسیون مایع را کاهش داد. برای بهینه‌سازی فرمولاسیون، پودری از مواد شیمیایی استفاده شد که تبدیل آن به حالت محلول و استفاده از آن را بهبود بخشید. همچنین از عوامل محافظت کننده در برابر UV (برای جلوگیری از تجزیه سریع در اثر تابش نور پس از اسپری کردن آن به سطح گیاه) استفاده شد (٦). این بهینه‌سازی‌ها علاوه بر کنترل کیفی دقیق‌تر و استانداردسازی قدرت آزمایش، باعث افزایش کارآیی سم در مزرعه تا شش برابر شد (٧).

به‌سازی سویه در دهه ١٩٦٠، منجر به جایگزینی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

بسیاری از محصولات اولیه با سویه‌های جدید Bt شد که تا ده برابر قوی‌تر از پیشینیان خود بودند. پژوهش‌ها برای یافتن سویه‌های جدید و بهتر هنوز ادامه دارد. بیشتر محصولات Bt از سویه kurstaki HD1 مشتق شده‌اند (برای نمونه Biobit، Dipel و Thuricide). اما از سویه‌های دیگر kurstaki SA-11 و kurstaki SA-12 بر علیه پروانه‌سانان، israeliensis بر علیه دوبالان و tenebrionis برای مبارزه با قاب بالان نیز در مبارزه با آفات استفاده می‌شود (۲۱). فهرست آفت‌کش‌های حاوی سویه‌های طبیعی Bt در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- فهرست آفت‌کش‌های حاوی سویه‌های طبیعی Bt

نام تجاری	زیرگونه و استرین Bt	گستره میزبانی
Able, Bactospeina, Condor, Costar, CRYMAX, Cutlass, Futura, Lepinox, Thuricide, Steward	kurstaki	Lepidoptera
Xentari Florbac, Agree, Design,	aizawai	Lepidoptera
Costar	kurstaki SA-12	Lepidoptera
Foil, Raven	kurstaki	Lepidoptera/Coleoptera
Thuricide, Biobit, Dipel, Foray, Javelin, Vault	kurstaki HD-1	Lepidoptera
M-Trak	Pseudomonas	Coleoptera
Mattch, MVP	Pseudomonas	Lepidoptera
Novodor, Trident	tenebrionis	Coleoptera
Biobit	kurstaki HD-1	Lepidoptera
Dipel	kurstaki HD-1	Lepidoptera
Florbac	aizawai	Lepidoptera
Costar	kurstaki SA-12	Lepidoptera
Delfin	kurstaki SA-11	Lepidoptera
Thuricide	kurstaki HD-1	Lepidoptera
Tekar	israeliensis	Diptera
Javelin	kurstaki SA-11	Lepidoptera
Bactimos	israliensis	Diptera
Vectolex GC	Bacillus sphaericus	Diptera
Bactospeine	kurstaki HD-1	Lepidoptera
Acrobe	israliensis	Diptera
Novodor	tenebrionis	Coleoptera
Trident	tenebrionis	Coleoptera

در سال‌های گذشته پژوهش‌ها و برنامه‌های ارزیابی سویه‌ها تنها شامل تست‌های بیوشیمیایی و زیست سنجی بود، اما امروزه برای یافتن اثر یک سم خاص از آزمون‌های بر پایه PCR استفاده می‌شود. با این روش می‌توان تعیین کرد که افزایش قدرت یک سم، در اثر افزایش بیان ژن و یا به‌دلیل حضور یک پروتئین جدید ایجاد شده است. حضور یک سم جدید می‌تواند چشم‌اندازی از کنترل گستره متفاوتی از آفات را ارائه دهد (۳۲). برای طراحی و ساخت گستره‌ای از میزبان‌ها دو راه وجود دارد؛ یکی از این دو راه کشف سموم جدید و دیگری ایجاد سویه‌های جدید باکتریایی است. سویه‌های جدید حاوی ترکیب ناشناخته‌ای از سموم موجود هستند. این سویه‌های جدید به دو صورت هم‌یوغی (conjugation) و تراریختگی مستقیم (direct transformation) ایجاد می‌شوند (۸ و ١٤). جدول ۲ به شماری از این آفت‌کش‌ها اشاره دارد. برای آفت‌کش‌های ترکیبی تولید شده به روش هم‌یوغی، می‌توان به فویل (Foil)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

اشاره کرد. این محصول حاوی Cry1Ac از *Bt* subsp. *kurstaki* برعلیه کرم ساقه خوار ذرت اروپایی و Cry3A از *Bt subsp. tenebrionis* برعلیه سوسک سیب زمینی کلرادو (*Leptinotarsa decemlineata*) است.

جدول ۲- فهرست برخی از آفت‌کش‌های ترکیبی دارای سویه‌های جدید Bt

محصول	استرین/ژن	راسته حشره
Transconjugant strains		
Agree	aizawai	Lepidoptera
Condor	kurstaki	Lepidoptera
Cutlass	kurstaki	Lepidoptera
Design	aizawai	Lepidoptera
Foil	kurstaki	Lepidoptera/Coleoptera
Recombinant strains		
Raven	Cry1Ac (x2), Cry3A Cry3Bb (imported)	Lepidoptera
CRYMAX	Cry1Ac (x3), Cry2A Cry1C (imported)	Lepidoptera
Lepinox	Cry1Aa, Cry1Ac (x2), Cry2A Cry1F-1Ac (imported)	Lepidoptera

برای انتقال پلاسمیدها نمی‌توان همیشه از روش هم‌یوغی استفاده کرد، به ویژه اگر دو پلاسمید با جایگاه آغاز همانندسازی مشابه (origins of replication) به یک سلول منتقل شوند. زیرا آنها با هم‌ناسازگار خواهند بود. در چنین مواردی ابتدا با استفاده از روش‌های کلونینگ استاندارد، ژن‌های مربوطه را به یک پلاسمید متفاوت در باکتری *Escherichia coli* منتقل می‌کنند سپس پلاسمید حاصل را با روش ترانسفورماسیون مصنوعی به سویه Bt وارد می‌کنند (۱). امروزه بازار آفت‌کش زیستی Bt تحت سلطه آزمایشگاه‌های Abbott (Chicago, IL) (از زمان مالکیت آفت‌کش‌های زیستی Novo-Nordisk در سال ۱۹۹۵) و Novartis (با ادغام Ciba و Sandoz در سال ۱۹۹۶ ایجاد شد) است. این دو شرکت، بیش از ۷۰ درصد تولید جهانی را به خود اختصاص داده‌اند. ۳۰ درصد باقیمانده در میان تقریبا ۳۰ شرکت تجاری با بیش از ۱۰۰ محصول متفاوت Bt تقسیم شده است که اغلب شامل یک سم Bt منفرد هستند. به استثنا برخی از آن‌ها که ترکیبی بیش از پنج سم متفاوت دارند.

کشت چندین میلیون هکتاری گیاهان Bt که نزدیک به ٤٠ درصد از کل گیاهان GM کاشته شده را شامل می‌شود، نشان از پذیرش فراگیر گیاهان حاوی پروتئین Bt از سوی کشاورزان است. پذیرش محصولات Bt در مقیاس بالا، می‌تواند به افزایش بهره‌وری محصولات و کاهش نیاز به آفت‌کش‌های شیمیایی و در نتیجه کاهش اثرات مخرب زیست محیطی شود (۱۹).

مزایا و معایب آفت‌کش Bt

استفاده از آفت‌کش‌های Bt به صورت اسپری در مقایسه با اسپری‌های شیمیایی دارای مزایایی مانند ایمنی، اختصاصی بودن و توان بالا است. همچنین به این دلیل که در محیط زیست تجزیه می‌شوند، می‌توانند وارد بازار بزرگ رقابت شوند. این مزیت آخری نیاز به دقت و توجه دارد، زیرا Bt زمانی موثر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

است که روی قسمتی از گیاه که توسط حشرات خورده می‌شود، حضور داشته باشد. معمولا از Bt زمانی استفاده می‌شود که لاروهای حشرات بسیار جوان هستند، زیرا لاروهای بزرگ‌تر تحمل بیشتری دارند. سم اسپری شده Bt، تنها برای چند روز روی سطح برگ باقی می‌ماند. نور UV، تغییرات آب و هوا، مواد شیمیایی محیطی موجود بر سطح برگ‌ها و حضور پروتینازها، باعث تجزیه شدن پروتئین‌های Cry می‌شوند. همچنین شمار زیادی از اسپورها از روی سطح برگ شسته شده و روی خاک می‌ریزند. حشره‌کش‌های Bt، به‌دلیل اختصاصی بودنشان بر علیه شمار محدودی از حشرات آفت و غیر موثر بودنشان بر حشرات مفید و غیر هدف (گیرنده‌های حد واسط اختصاصی برای پروتئین‌های Bt در حشرات هدف وجود دارد) و همچنین عدم پایداری آن‌ها در محیط زیست، به صورت جهانی و در سطح وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند و تا کنون هیچ مدرکی که نشان دهد Bt برای انسان و دیگر پستانداران خطرناک است، به دست نیامده است. در واقع بررسی‌های انجام شده تاکنون نشان داده که Bt یکی از بی‌خطرترین محصولات میکروبی شناخته شده است (۱۱). موش‌های آزمایشگاهی پس از تزریق زیر پوستی تعداد 10^6 اسپور یا استنشاق 10^7 اسپور باکتری، می‌توانند زنده بمانند. مواردی از مرگ پس از استنشاق تعداد 10^8 اسپور مشاهده شده است که این مقدار معادل 10^{12} اسپور برای انسان است و یک میلیون بار بیشتر از حداکثر میزانی است که در طول اسپری کردن Bt در مزرعه با آن مواجه می‌شوند (۳۹). البته نگرانی‌هایی در مورد پایداری اسپورهای Bt در خاک و آب وجود دارد که باعث می‌شود پژوهشگران به جای استفاده از اسپور باکتری، از کریستال‌های پروتئین خالص شده استفاده کنند. روش مصرف کریستال‌های خالص، تفاوتی با روش مصرف اسپور ندارد. اما پروتئین‌های Cry، بسیار آسیب‌پذیرتر از اسپورها هستند. در چند دهه اخیر، پروتئین δ– endotoxins در باکتری *Pseudomonas fluorescens* بیان شده است. این باکتری یک باسیل گرم منفی و هوازی اجباری است که توانایی زیستن در محیط‌های مختلفی مانند گیاهان، خاک و سطح آب را دارد و تولید یک نوع رنگدانه محلول با خاصیت فلورسنت به نام پایووردین (pyoverdine) را می‌کند. همچنین این باکتری‌ها، بسیار آسان و سریع تکثیر می‌شوند و در محیط حداقل رشد می‌کنند. برگزیدن این باکتری بدین دلیل است که در حالت طبیعی روی برگ‌ها کلونی تشکیل می‌دهند و هیچ ویژگی بیماری‌زایی از آن‌ها در حیوانات و گیاهان دیده نشده است (۱۵). برای نمونه، کمپانی Mycogen که MVP را برای مقابله با آفت پروانه‌سانان و M-Trak را برای مقابله با قاب‌بالان تولید می‌کند، از این روش استفاده نماید (۱۰). قرار دادن پروتئین‌های Cry در باکتری، آن‌ها را در مقابل تجزیه شدن توسط نور UV و مواد شیمیایی محافظت می‌کند و اجازه می‌دهد تا هر پروتئین Cry در مقیاس زیادی بیان شوند. اما باکتری *P. fluorescens* به اندازه اسپور Bt در آب و خاک پایدار نیست. موسسه پژوهشی بین المللی Crop Genetics روش ساده‌ای با استفاده از بیان ژن *Cry1Ac* یک باکتری همزیست به نام *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* به‌کار برده است. این باکتری دارای توان رخنه در سیستم آوندی گیاهان را دارد در نتیجه طول عمر پروتئین زیاد خواهد شد. از این روش در مبارزه با کرم ساقه خوار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

اروپایی بهره گرفته می‌شود (٤٤).

از دیگر کاربردهای Bt می‌توان به قابلیت آن در کنترل پشه و مگس‌های بیماری‌زا در انسان اشاره کرد. *Bt* subsp. *israeliensis* یا BTi در سال ۱۹۷٦ و در فلسطین اشغالی جدا شد و نشان داد که روی لارو دوبالان مانند مگس سیاه و پشه موثر است (۱۳). در حالی‌که بیشتر سویه‌های Bt برای استفاده به عنوان حشره‌کش موضعی در کشاورزی، توسعه پیدا می‌کردند، زیرگونه israelensis در آب‌های راکد و برای جلوگیری از گسترش مالاریا استفاده شد (۱۲). در این باکتری، ژن‌های کد کننده چهار پروتئین سم Cry به‌نام‌های Cry4Aa، Cry4Ba، Cry10Aa، Cry11Aa به‌همراه دو ژن کد کننده پروتئین‌های Cyt1Aa و Cyt2Ba روی یک پلاسمید خیلی بزرگ به نام pBtoxis قرار دارند (۳). این دو پروتئین با یکدیگر دارای همکاری هستند. پروتئین Cyt به‌طور مستقیم با لیپید غشایی موجود در روده لارو واکنش داده و برای پروتئین Cry نقش گیرنده را اجرا می‌کند. این نوع سموم که حاوی ذرات کوچکترند، بسیار موثرتر هستند، زیرا برای مدت طولانی‌تری معلق می‌مانند و راحت‌تر توسط لاروها خورده می‌شوند. ذرات سنگین‌تر که ته‌نشین شده و با لایه‌ای از گل و لای پوشانیده می‌شوند، به سرعت غیر فعال می‌شوند. به‌همین دلیل متخصصین محصولاتی را تولید کرده‌اند که به کندی آزاد شوند. برای نمونه، Bt را در قطعات بسیار کوچک یخ قرار داده‌اند تا روی سطح آب قرار گیرند و یا از *Bacillus sphaericus* استفاده می‌کنند که موثرتر از زیرگونه israelensis هستند (۱۲).

توسعه محصولات تراریخته Bt

اصطلاح GMOs یا (genetically-modified organisms) بیشتر به گیاهان زراعی ایجاد شده برای مصرف انسان یا حیوان اشاره دارد که برای تولید آن‌ها از آخرین تکنیک‌های زیست مولکولی استفاده شده است. روی این گیاهان اصلاحاتی به‌منظور تقویت ویژگی‌های مطلوب مانند مقاومت به علف‌کش یا افزایش ارزش غذایی محصول، انجام گرفته است. در گذشته به‌صورت سنتی برای تقویت ویژگی‌های مطلوب از روش اصلاح نباتات استفاده می‌شد، اما این روش بسیار وقت‌گیر و معمولا از دقت بالایی برخوردار نیست. از سوی دیگر در روش‌های مهندسی ژنتیک، صفت مورد نظر با سرعت و دقت بسیار بالاتری ایجاد می‌شود. برای نمونه، ژن مسئول مقاومت به خشکی را می‌توان از گیاهی جدا کرده و به گیاه دیگری منتقل کرد. گیاهی که بدین‌ترتیب دستکاری ژنتیکی شده است نیز به خشکی مقاوم خواهد بود (٤٥).

یکی از معایب عمده اسپری کردن آفت‌کش Bt، کوتاه بودن اثربخشی آن است. در آب و هوای بد، این اثر بخشی می‌تواند به چند ساعت کاهش یابد. به‌همین دلیل، برای این‌که سم روی تمام جمعیت لاروها اثر بگذارد، اسپری موضعی Bt باید چند بار در فصل رشد اعمال شود. افزایش دفعات اسپری کردن باعث افزایش مصرف سوخت می‌شود. علاوه بر این، اسپری موضعی، اثر کمی روی آفت‌های cryptic (برای نمونه، حشراتی که شیره گیاهان را می‌مکند و لاروهایی که نزدیک ریشه‌ها تغذیه می‌کنند)، دارد. یک راه حل بالقوه برای هموار نمودن این مشکل، در اوایل دهه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

۱۹۸۰ ارائه شد. دانشمندان ژن‌های *Cry* را وارد گیاه توتون و گوجه‌فرنگی کردند، به‌طوری که پروتئین‌ها به‌طور مستقیم در بافت گیاه بیان شدند (۲۳). یک شرکت بلژیکی به نام Plant Genetic Systems پیشگام در استفاده تجاری از تکنولوژی Bt تراریخته شد. در نسل اول گیاهان کشت شده آزمایشی، پروتئین Cry قابل تشخیص نبود. آزمایش‌هایی برای یافتن دلیل بیان ژن‌ها در سطح کم انجام گرفت که بیشتر روی تفاوت بین سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی متمرکز بود، زیرا پروتئین‌های نوترکیب Cry در سطوح بالایی در باکتری‌های هترولوگ بیان می‌شوند (۳۰).

یکی از دلایل بیان کم پروتئین Cry، تفاوت زیاد بین متوسط مقدار GC در DNA گیاهان و Bt است، علاوه بر این تفاوت‌هایی در codon preference وجود دارد که می‌تواند به عنوان عامل سنتز پروتئین با کارآیی کم به شمار آید. ژن‌های باکتریایی همچنین حاوی توالی ATTTA به تعداد زیاد هستند که در گیاهان به عنوان سیگنال جهت افزایش نرخ گردش mRNA (mRNA turnover) عمل می‌کند. پرلاک و همکاران (۱۹۹۱) توالی ژن‌های *Cry1Ab* و *Cry1Ac* را تغییر دادند به‌طوری که محتوی GC آن افزایش یافت. همچنین توالی‌هایی با چهار یا بیش از چهار آدنین یا تیمین متوالی را تعویض کردند. از تغییرات دیگر می‌توان به تغییر codon preference در جهتی که مورد علاقه گیاهان باشد، اشاره کرد. در نهایت افزایش سطح پروتئین تا بیش از صد برابر و دستیابی به کل بازده برابر با ۰/۰۲ کل پروتئین محلول گیاه دستاورد این تلاش‌ها بود. اما این میزان هنوز برای کنترل موثر آفت کافی نیست. با استفاده از پروموترهای قوی‌تر، پلی‌آدنیلاسیون و سیگنال‌های خاتمه دهنده کارآمدتر و همچنین با قرار دادن یک اینترون هترولوگوس در ساختمان بیانی، سطح بیان ژن را باز هم می‌توان افزایش داد. توسعه سنتز ژن *Cry* به صورت مصنوعی که برای بیان در گیاهان بهینه‌سازی شده بود، بدین معنی بود که پروتئین‌های Cry به زودی در سطح ۰/۲ تا یک درصد پروتئین‌های محلول بیان می‌شدند (۲۲) و هنگامی که ژن‌های *Cry* در ژنوم کلروپلاست معرفی شدند، این میزان تا بالای پنج درصد افزایش پیدا کرد (۲۶).

پس از نتایج موفقیت‌آمیز آزمایشگاهی، نخستین آزمایش‌های Bt تراریخته در سطح مزرعه در سال ۱۹۸۶ در آمریکا و فرانسه انجام شد. این گیاهان تراریخته یک ژن کوتاه از قسمت سمی N ترمینال Cry1A از *Bt* subsp. *kurstaki* strain HD-73 را کد می‌کردند که دارای پروموتر 35S ویروس موزاییک گل کلم بود و گیاه را در برابر آفتی به نام *Helicoverpa zea* محافظت می‌کرد که یک آفت شناخته شده با گستره بالای میزبانی مانند کرم غوزه پنبه، کرم خوشه ذرت و کرم میوه گوجه‌فرنگی است (۱۶).

ایالات متحده آمریکا مشتاقانه و با آغوش باز توسعه Bt در کشاورزی را پذیرفته است و در حال حاضر دارای بیشترین میزان سطح زیر کشت Bt است. البته شمار کشورهایی که Bt را پذیرفته‌اند و سطح زیر کشت‌شان در سال‌های گذشته افزایش یافته روندی فزاینده را نشان می‌دهد (۱۸). اگرچه برزیل و آرژانتین در کشت Bt در رتبه‌بندی جهانی مقام دوم و سوم را دارند، چین و هند در پذیرفتن Bt سرعت زیادی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

داشتهاند. این به این دلیل است که هر دو از بزرگترین تولید کنندگان پنبه هستند و چین به ویژه بزرگترین تولید کننده برنج است. برنج Bt برای نخستین بار در سال ۱۹۹۸ در چین در مزرعه کاشته شد.

آیا محصولات تراریخته باعث ایجاد حشرات مقاوم خواهد شد؟

همه حشرهکشها فشار انتخاب را روی جمعیت هدف ایجاد میکنند. نحوه عمل سموم Bt، (اتصال به یک گیرنده خاص روی سلولهای اپیتلیال روده) یک فرصت برای تکامل به سمت مقاوم شدن آفات را فراهم میکند. نخستین شواهد این روند در سال ۱۹۸۵ زمانی که شب پره هندی (*Plodia interpunctella*) در مغازههای فروش غلات که قبلا با اسپورهای Bt اسپری شده بودند یافت شد، بدست آمد. فشار انتخاب را در آزمایشگاه نیز میتوان ایجاد کرد. طی آزمایشی پس از پانزده نسل یک گونه نیمه مقاوم به یک گونه مقاوم تکامل پیدا کرد (۲۷). مقاومت در جمعیت وحشی شب پره پشت الماسی با نام علمی *Plutella xylostella* که از ترتیزک آبی تغذیه میکند، در هاوایی دیده شد. این گیاهان تا چهارصد بار با Bt اسپری شده بودند (۲٤). آزمایشها نشان داد که میتوان شمار زیادی از گونههای مقاوم به Bt را تولید کرد که در طبیعت وجود ندارند. گمان میرود که استفاده پشت سر هم، از یک پروتئین Cry، باعث مقاوم شدن گونهها میشود (٤۱).

تولید کنندگان Bt، از خطر مقاوم شدن آفات آگاه هستند و بسیاری از فروشندگان بذر بر عقد توافقنامه با مشتریان اصرار دارند. در این توافقنامهها، خریداران به اقدامات پیشگیرانه زیر متعهد شوند. برای نمونه، استراتژی refugia که در آن بخشی از زمینی که محصولات Bt در آن کشت شده است، باید به کشت غیرتراریخته اختصاص یابد تا از ایجاد آفات مقاوم جلوگیری شود. با استفاده از این استراتژی میتوان از ایجاد جمعیتهای مقاوم، حتی در مناطقی که بهمدت پانزده سال با تراکم بالایی محصولات Bt کشت شده، جلوگیری کرد. تباشنیک و همکاران روی جمعیت آفات در مناطق زیر کشت Bt در ایالات متحده آمریکا، استرالیا، چین و اروپا بررسیهایی انجام دادهاند. آنها دریافتند که در میان شش حشرهی آفت اصلی، مقاومت تنها در یکی از گونهها (Helicoverpa zea) و تنها در تعدادی از مناطق در Arkansas و Mississippi رخ داد. در کارولینای شمالی که مناطق refuge بزرگتری دارد، مقاومت دیده نشده است (٤۲). تاثیر طولانی مدت نخستین نسل محصولات Bt در برابر تقریبا همه جمعیتهای آفت، برای بیش از یک دهه، بیش از حد انتظار بسیاری از حشرهشناسانی بود که روی ژنتیک جمعیت کار میکنند (۵).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

References **فهرست منابع**

1- Arantes O, Lereclus D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Gene. 108:115-119.

2- Aronson A. 2002. Sporulation and δ-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 59:417-425.

3- Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones AF, Murphy L, Quail MA, Holden MT, Harris D, Zaritsky A, Parkhill J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and environmental microbiology 68:5082-5095.

4- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. Journal of bacteriology 188:3391-3401.

5- Bourguet D. 2004. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: what chance for Bt maize? Physiological Entomology 29:251-256.

6- Burges HD, Jones KA. 1998a. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. In: Formulation of microbial biopesticides. Vol., ed.^eds. Springer, 33-127.

7- Burges HD, Jones KA. 1998b. Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In: Formulation of microbial biopesticides. Vol., ed.^eds. Springer, 311-332.

8- Carlton BC, Gonzalez JM, Jr. 1985. Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Molecular biology of microbial differentiation 246-252.

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

10- Crickmore N. 2006. Beyond the spore–past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. Journal of applied microbiology 101:616-619.

11- Federici BA, Siegel JP, Hammond B. 2008. Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* and Bt crops used in insect control. Food safety of proteins in agricultural biotechnology. 45-102.

12- Fillinger U, Knols BG, Becker N. 2003. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and Bacillus sphaericus formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. Tropical Medicine and International Health 8:37-47.

13- Goldberg LJ, Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univitattus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosq. News 37:355-358.

14- Gonzalez JM, Brown BJ, Carlton BC. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of B. thuringiensis and B. cereus. Proceedings of the National Academy of Sciences 79:6951-6955.

15- Hernandez-Rodriguez CS, Escudero IR, Asensio AC, Ferre J, Caballero P. 2013. Encapsulation of the *Bacillus* thuringiensis secretable toxins Vip3Aa and Cry1Ia in Pseudomonas fluorescens. Biological Control 66:159-165.

16- Hoffmann MP, Zalom FG, Wilson LT, Smilanick JM, Malyj LD, Kiser J, Hilder VA, Barnes WM. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* ∂-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 85:2516-2522.

17- Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 201**0.** *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

perspective. Bioengineered bugs 1:31-50.

18- James C. 2015. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010, Vol., International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA.

19- James C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010, Vol., International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA.

20- Joung KB, Horticultural R. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, Vol., Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch.

21- Kaur S. 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16:781-793.

22- Koziel MG, 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Nature biotechnology 11:194-200.

23- Krattiger AF. 1996. Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries: The International Agricultural Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA).

24- Liu YB, Tabashnik BE. 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 264:605-610.

25- Martin PA, Travers RS. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Applied and Environmental Microbiology 55:2437-2442.

26- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogen PS, Stalker DM, Maliga P. 1995. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. Nature Biotechnology 13:362-365.

27- McGaughey WH. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229:193-195.

28- Osman, GEH, Already R, Assaeedi ASA, Organji SR, El-Ghareeb D, Abulreesh HH, Althubiani AS. 2015. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a Comprehensive Review. Egyptian Journal of Biological Pest Control 25:271-288.

29- Palma, L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins 6:3296-3325.

30- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 88: 3324-3328.

31- Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71:255-281.

32- Porcar M, Juarez-Perez V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews 26:419-432.

33- Rodriguez-Almazan C, Zavala LE, Munoz-Garay C, Jimenez-Juarez N, Pacheco S, Masson L, Soberon M, Bravo M. 2009. Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: Demonstration of the role of oligomerization in toxicity. PLoS One 4: e5545.

34- Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Journal of microbiology and biotechnology 17:547.

35- Salehi Jouzani G, Seifinejad A, Saeedizadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilivand S, Mousivand M, Jahangiri R, Yazdani M, Amiri RM, Akbari S. 2008. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. Canadian journal of microbiology 54:812-822.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

36- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant biotechnology journal 9:283-300.

37- Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. Agronomy for sustainable development 28:11-20.

38- Saraswathy N, Kumar PA. 2004. Protein engineering of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Electronic Journal of Biotechnology 7:178-188.

39- Siegel JP. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. Journal of invertebrate pathology 77:13-21.

40- Soberon M, Gill S, Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? Cellular and molecular life sciences 66:1337-1349

41- Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carriere Y. 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences 102:15389-15393.

42- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carriere Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. Nature biotechnology 26:199-202.

43- Tan SY, Cayabyab BF, Alcantara EP, Huang F, He K, Nickerson KW, Siegfried BD. 2011. Comparative susceptibility of Ostrinia furnacalis, Ostrinia nubilalis and Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. Crop Protection 30:1184-1189.

44- Vilas-Boas G, Peruca A, Arantes O. 2007. Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and *Bacillus thuringiensis*. Canadian journal of microbiology 53:673-687.

45- Whitman DB. 2000. Genetically modified foods: harmful or helpful? CSA Discovery guides 1-13.

46- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:9897-9902.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]

A review on *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) as bioinsecticide

Maryam Sadeghi, Akram Sadeghi*, Ebrahim Karimi
M.Sc of Iranian Biological Resource Center (IBRC), Karaj, Iran
*Assistant Professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran
M.Sc of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract
Regarding to the potential adverse environmental effects of chemical insecticides, some alternative approaches like biological control agents have been proposed to address this problem. One of the promising alternative is use of Entomopathogenic Bacteria such as *Bacillus thuringiensis* (Bt). During sporulation, Bt produces crystalline inclusion proteins comprising different groups of cry and cyt toxins. Cry proteins target insects in the orders Lepidoptera, Diptera, Coleoptera and Hymenopterans as well as nematodes. High toxicity to Diptera has been reported for Cyt proteins. As individual Cry toxin has a defined spectrum of insecticidal activity, usually restricted to a few species in one particular order, recently researchers have been reported a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein (VIP) with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Bt produces various virulent factors including secreted insecticidal protein toxins (exotoxins). Strain engineering efforts have continued to extend the Bt host range. Strain improvement led to the replacement of many of the early products with new Bt strains that were more potent than their predecessors, and the search for new and better strains continues to this day. Transgenic crop plants (Bt crops) have been commercialized that express several Cry and/or cyt from Bt.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Bt crops, crystalline proteins, secreted protein

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.2.9.3]