

PhD Dissertation



Structural and functional diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins on animal, plant and microbial cells

By: **Ayda Khorramnejad**

Supervisors

Dr. Reza Talaei-hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Dr. Yolanda Bel Cortes

PhD in
Agricultural Entomology University of Tehran
and
Biotechnology and Biomedicine University of
Valencia

November 2018



University of Tehran
College of Agriculture & Natural Resources
Plant Protection Department



Universitat de València
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Genètica

Diversidad estructural y funcional de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* y su efecto en animales, plantas y células microbianas

Tesis realizada por
Ayda Khorramnejad

Directores

Dr. Reza Talaei-Hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Dra. Yolanda Bel Cortes

Programa de Doctorado de Biotecnología y Biomedicina
Universitat de València

Noviembre 2018



University of Tehran
College of Agriculture & Natural Resources
Plant Protection Department



Universitat de València
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Genètica

Diversidad estructural y funcional de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* y su efecto en animales, plantas y células microbianas

Tesis realizada por
Ayda Khorramnejad

Directores

Dr. Reza Talaei-Hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Dra. Yolanda Bel Cortes

Programa de Doctorado de Biotecnología y Biomedicina
Universitat de València

Noviembre 2018

Resumen

Bacillus thuringiensis (Bt) es uno de los agentes entomopatógenos de mayor éxito en el control biológico de plagas. La identificación de nuevas cepas es importante para descubrir nuevas toxinas de Bt que amplíen la gama de actividades insecticidas y poder gestionar el problema de la aparición de resistencia en insectos. Por ello, cepas iraníes de Bt se analizaron comprobando su toxicidad contra *Plodia interpunctella*. Se seleccionó un grupo de cepas con diversa actividad larvicida y se caracterizó de acuerdo con su contenido de genes, composición de proteínas, el espectro de actividad insecticida contra lepidópteros plaga y líneas celulares de insectos, la producción de β -exotoxina, la actividad antimicrobiana y los efectos bioquímicos sobre las células vegetales. Como resultado, las cepas AzLp, IE-2 e IP-2 Bt se propusieron como candidatos para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas. La inoculación de plantas de tomate con mezclas de esporas y cristales de las cepas Bt seleccionadas, provocó un aumento la actividad de enzimas antioxidantes e indujo resistencia frente a probables invasiones de patógenos y al estrés biótico y abiótico, pero no indujo actividades antimicrobianas contra fitopatógenos tales como el hongo *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* y / o la bacteria *Erwinia* sp.

El análisis del contenido de genes de las cepas de Bt con más capacidad insecticida condujo al aislamiento del gen cry1Ia38 de la cepa IE-1. Posteriormente, el gen se clonó y expresó. Nuestros resultados muestran que la proteína Cry1Ia38 tiene un gran potencial para controlar *Ostrinia nubilalis* y *Grapholita molesta*. Debido a las características particulares de las proteínas Cry1I, se investigó la posible formación de una estructura oligomérica y su posible asociación con la actividad insecticida de esta proteína. Según nuestros resultados, parece que la oligomerización no es un proceso generalizado entre las toxinas Cry1Ia.

Palabras clave: Líneas celulares de insecto, LC-MS/MS, Proteínas Cry1Ia, Formación de oligómeros, Actividad antimicrobiana, Respuesta bioquímica en plantas.

Antecedentes

Debido a los efectos nocivos de los insecticidas químicos en los ecosistemas y sobre los organismos beneficiosos, la implementación de agentes de control biológico ha recibido considerable atención. Entre los agentes de control biológico, se ha dedicado gran interés a los entomopatógenos, debido a su potencial para controlar plagas agrícolas y domésticas, vectores de enfermedades humanas y animales, sin introducir material no degradable en el medio ambiente. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el agente de control microbiano comercial más utilizado en la actualidad, con efectividad contra diferentes especies de insectos plaga. Las cepas de Bt producen cristales paraesporales proteínicos durante la fase de esporulación del crecimiento bacteriano llamados proteínas δ -endotoxina o Cry (de cristal). Además, esta bacteria, durante la fase de crecimiento vegetativo, produce otro tipo de proteínas insecticidas, como son las CryII, Vip y Sip. Las proteínas CryII no forman parte del cristal Bt, pero también se denominan "Cry" porque comparten una estructura de 3 dominios con la mayoría de las proteínas cristalinas. Las proteínas insecticidas Cry de Bt son altamente selectivas, no tóxicas para los vertebrados y rápidamente degradables. Debido a estas características, Bt ha ganado una gran importancia en el control de plagas de insectos agrícolas y muchos estudios se han centrado, en el pasado y presente, en el aislamiento y la caracterización de nuevas cepas que puedan conducir a encontrar nuevas toxinas con un espectro de actividad más amplio y mayor toxicidad insecticida.

Objetivos

La importancia de Bt en el control biológico de plagas, hizo que esta tesis tuviese los siguientes objetivos:

- - Caracterización de nuevos aislados de Bt iraníes
- - Expresión, aislamiento y purificación de nuevas proteínas insecticidas (CryIIa)
- - Evaluación de la actividad insecticida y citotóxica de las toxinas CryIIa
- - Estudio de la oligomerización en el modo de acción de las proteínas CryIIa
- - Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas Bt.

- Determinación de los efectos bioquímicos de las cepas de Bt en células vegetales

De acuerdo con estos objetivos, la tesis se ha dividido en seis partes principales que corresponden a cada uno de ellos.

Materiales y Métodos

Los materiales y métodos generales utilizados en este trabajo se describen a continuación. Las metodologías específicas utilizadas para alcanzar cada uno de los seis objetivos principales de esta tesis, se describirán posteriormente, bajo el título de cada uno de ellos.

- **Cepas bacterianas**

En este estudio se utilizaron un total de 130 cepas de Bt iraníes, del stock de Bt del Biological Control Laboratory (Universidad de Teherán). Además, las cepas *B. thuringiensis* HD1 (HD1S2005, proporcionada por Valent Bioscience, Inc., Libertyville, IL, EE. UU.) y *B. thuringiensis* subesp *thuringiensis* HD2 (Berliner, obtenida del Bacillus Genetic Stock Centre, BGSC, Universidad Estatal de Ohio, Ohio, EE. UU.), se usaron como cepas de referencia. Las cepas DH α 5 y BL21 (DE3) de *Escherichia coli* se emplearon para la clonación de genes y la expresión de proteínas.

- **Cría de insectos**

Para realizar los experimentos de toxicidad (bioensayos) y los ensayos de formación de oligómeros, se utilizaron ocho especies de lepidópteros plaga y una de coleópteros. Las especies de insectos lepidópteros utilizados en los bioensayos fueron *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *Mamestra brassicae* y *Helicoverpa armígera*, que pertenecen a la familia Noctuidae, y *Grapholita molesta*, *Plodia interpunctella* y *Ostrinia nubilalis*, que pertenecen a las familias Tortricidae, Pyralidae y Crambidae, respectivamente. *Lobesia botrana* (Tortricidae), *O. nubilalis* y el coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (familia Chrysomelidae), se usaron para la preparación de vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) y la realización de los ensayos de formación de oligómeros. Todas las colonias de insectos se criaron en dieta artificial y se mantuvieron a 25 ± 1 °C, humedad relativa (HR) de $70 \pm 5\%$ y con fotoperiodo de 16:8 horas de luz/oscuridad (L/O).

- **Líneas celulares de insecto**

Se utilizaron cuatro líneas celulares: BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) de células de ovario de *Trichoplusia ni*, RP-HzGUTAW1 (HzGUT) de células de intestino de *Helicoverpa zea*, UCR-SE de *S. exigua* y Sf21 (de células de ovario de *S. frugiperda*). Las líneas celulares

se cultivaron en medios de cultivo celular apropiados y se mantuvieron en las condiciones recomendadas por los proveedores.

- **Preparación de vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV)**

Las vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) se realizaron a partir de intestinos de larvas de último estadio de *O. nubilalis* y *L. decemlineata*, o de larvas enteras de *L. botrana*, mediante el método de precipitación diferencial con magnesio (Wolfersberger *et al.*, 1987), modificado por Escrache *et al.*, (1995). Las BBMV se cuantificaron mediante Bradford y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso.

- **Producción, solubilización y activación de protoxinas**

Las cepas de *B. thuringiensis* se crecieron en medio CCY y se incubaron 2 días a 29°C. La producción y la solubilización de las proteínas cristalinas de Bt se realizó según lo descrito por Estela. *et al.*, (2004). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). La activación de la protoxina se llevó a cabo añadiendo 10% de tripsina e incubando la muestra 2 horas a 37 ° C. Las proteínas solubilizadas y activadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo Laemmli 1970.

- **Expresión, purificación y activación de proteínas Cry clonadas**

La proteína Cry1Ab se obtuvo de una cepa recombinante de *E. coli* GG094-208 (Dr. R. A. de Maagd, Universidad de Wageningen, Países Bajos). La proteína Cry1Ia7 (Martínez *et al.*, 2004), fue cedida por el Dr. Primitivo Caballero (Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España). Las proteínas Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V y Cry1Ia7 se expresaron en las células recombinantes de *E. coli*, BL21 (DE3) en esta tesis.

La expresión, purificación, solubilización y activación de Cry1Ab, se realizó siguiendo Sayyed *et al.* (2005). La purificación de la toxina activada se realizó por cromatografía de intercambio aniónico con una columna MonoQ 5/5 usando el Äkta 100 Explorer (GE Healthcare, Reino Unido). Las fracciones eluidas se analizaron individualmente mediante SDS-PAGE.

La expresión de las proteínas Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V y Cry1Ia7 en células BL21 (DE3) de *E. coli*, su purificación por cromatografía de afinidad usando columnas

HisTrap™ FF crude (GE Healthcare Bio-Sciences, Upsala, Suecia), diálisis y activación con tripsina, se realizaron según Khorramnejad *et al.* (2018).

Las concentraciones de Cry1Ab, Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V y Cry1Ia7, se estimaron por densitometría mediante el programa TotalLab Quant, version 12.3, usando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar.

Metodología específica por objetivos

Primera parte: Caracterización de cepas Iraníes de *B. thuringiensis*

Aislamiento de las cepas de Bt

Se usó el método de selección con acetato para aislar, inicialmente, cepas Bt de diferentes muestras. El acetato de sodio inhibe selectivamente la germinación de esporas de Bt. Las esporas germinadas y otras bacterias no esporulantes, se eliminaron por tratamiento térmico (7 min a 80 °C). Posteriormente las muestras se plaquearon en agar nutritivo y se dejaron crecer o/n a 29 °C. Las colonias obtenidas se examinaron mediante tinción de Gram y se observó la presencia de cristales paraesporales mediante microscopía de contraste de fases. Los aislados de Bt se clasificaron como tales tras observar su capacidad de producir cristales paraesporales.

Bioensayos

La selección preliminar de las cepas de Bt, se realizó observando su toxicidad contra larvas de segundo estadio de *P. interpunctella*. Los bioensayos se realizaron con una concentración única discriminante de 10⁸ células/ml (superior a la CL50 calculada) mediante el método de incorporación en dieta. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 20 larvas, con tres repeticiones. Como control negativo se usó agua. La mortalidad se registró tras 72 horas de tratamiento. Como resultado, se seleccionaron siete cepas de Bt y se bioensayaron contra larvas neonatas de *S. exigua*, *G. molesta*, *O. nubilalis* y *M. brassicae* por el método de contaminación de la dieta en superficie (Hernández-Martínez *et al.*, 2008). Los bioensayos se realizaron con protoxinas y toxinas activadas, y se repitieron tres veces, con 48 larvas por réplica. El tampón de solubilización y HD1 se

usaron como control negativo y cepa de referencia, respectivamente. Los bioensayos se realizaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y 16:8 L/O. La mortalidad se registró a los 7 días.

- **Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad celular se registró usando CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega Co., Madison, WI, EE. UU.), basado en la detección de la reducción de sal de tetrazolio (MTT- 3- (4,5-Dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H). Los ensayos se realizaron utilizando cuatro líneas celulares de los lepidópteros T. ni (Hi5), H. zea (HzGUT), S. exigua (UCR-SE) y S. frugiperda (Sf21). La actividad citotóxica fue investigada mediante observación microscópica, ensayo de dosis única y ensayo de dosis-respuesta. Para determinar dicha actividad, se realizó un ensayo de dosis única con las proteínas de los cristales de las cepas Bt seleccionadas solubilizadas y activadas, frente a cada una de las cuatro líneas celulares. Posteriormente, se realizaron ensayos de dosis-respuesta para las cepas más tóxicas contra las líneas celulares de insectos más susceptibles. Para los ensayos de dosis única, se usaron 10 μg de proteína solubilizada o 7 μg de toxina activada. Para el ensayo de dosis-respuesta, las células se trataron con diferentes concentraciones de toxina (0,64, 3,2, 16, 80 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los cambios morfológicos inducidos por las toxinas se registraron tras observación microscópica (Leica DMI 3000B), en diferentes tiempos (1, 3, 6 y 16 horas) después de la exposición a la toxina. La viabilidad celular se midió 16 horas después de tratar las células en los ensayos de dosis única, y 6 horas después de la exposición en ensayos de dosis-respuesta. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron dos veces.

Perfil proteico y análisis proteómico

Las proteínas activadas y solubilizadas se analizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli 1970) para obtener el perfil proteico.

Técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) realizadas en la instalación de proteómica del SCSIE (Servei Central de Apoyo a la Investigación Experimental), en la Universitat de València (Valencia, España) se utilizaron para la obtención del perfil proteómico.

- **Identificación del contenido génico**

El ADN total de cada cepa Bt seleccionada se extrajo y purificó siguiendo Ferrandis *et al.* (1999). Las cepas se caracterizaron genéticamente usando 27 pares de cebadores diseñados en este trabajo o descritos previamente en la bibliografía. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN amplificado se purificó usando NucleoSpin Gel y kit de limpieza de productos de PCR (MACHEREY-NAGEL, Alemania) y se secuenció (Stab Vida, Investigación y Servicios en Ciencias Biológicas Lda, Portugal). Las secuencias fueron editadas y analizadas utilizando Geneious (versión 10.0.9). Los análisis de la secuencia de ADN se realizaron usando la base de datos NCBI.

- **Production de β -exotoxina**

La posible presencia de β -exotoxina en las cepas de Bt se determinó mediante LC-MS / MS. La preparación de la muestra se realizó según lo descrito por Hernández *et al.* 2003.

Segunda Parte: Aislamiento, clonación, expresión y purificación de nuevas proteínas insecticidas

La caracterización exhaustiva de la cepa IE-1 (aislada de las larvas infectadas de *Ephesia kuehniella*) dio lugar al descubrimiento de un nuevo gen tipo cryIIa, que fue denominado *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Number MG584186).

Clonaje del gen *cryIIa38*

El gen completo *cryIIa38* se clonó a partir del ADN genómico extraído de la cepa IE-1. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen por PCR fueron Ia38-F (5'GGATCCATGAACTAAAGAATCAAGAT 3') e Ia38-R (5'GTCGACCTACATGTTACGTTACGCTCAATC 3'). Después de la amplificación, los productos de PCR se clonaron en el vector de clonación pGEM-Teasy. Posteriormente, el gen *cryIIa38* clonado se subclonó en el vector de expresión, pET-30a (+). La construcción resultante se transformó en células *E. coli* DH α 5. La secuencia insertada se confirmó mediante secuenciación con iniciadores de inserción, en ambas direcciones. Después de la secuenciación, los transformantes exitosos se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión. La proteína CryIIa38 producida se

purificó por cromatografía de afinidad (ver "Expresión, purificación y activación de proteínas Cry clonadas").

- **Mutagénesis dirigida**

La sustitución de Ile¹¹⁶ por Val en la posición 116 se realizó mediante PCR de solapamiento-extensión, usando el gen *cryIIa38* clonado en pET-30a (+) como molde. La secuenciación del ADN verificó la mutación puntual.

Tercera parte: Investigación de las propiedades insecticidas y citotóxicas de las toxinas CryIIa

La caracterización molecular, actividades insecticidas y citotóxicas de la protoxina CryIIa38 y de la proteína activada, se estudiaron usando larvas neonatas de *O. nubilalis*, *G. molesta*, *H. armigera*, *S. exigua* y *S. littoralis*, a una concentración de 1000 ng / cm² por el método de contaminación en superficie. Además, las actividades citotóxicas de CryIIa38 protoxina y de toxina se determinaron contra la línea celular Sf21, usando cuatro concentraciones diferentes (0,16, 0,8, 4 y 20 µg / ml).

La actividad insecticida de CryIIa38-I116V (protoxina y toxina activada) se evaluó contra neonatos de *O. nubilalis*, *S. exigua*, *G. molesta* y *S. littoralis* a 1000 ng / cm², como se ha descrito anteriormente. Las actividades citotóxicas también se determinaron contra la línea celular Sf21, a las cuatro concentraciones usadas para CryIIa38.

Para comparar las actividades insecticidas con otras proteínas CryIIa, se escogió la toxina CryIIa7, previamente analizada y clonada, y disponible en el Laboratorio de Control Biotecnológico de Plagas (Departamento de Genética, Universitat de València), donde se ha realizado esta tesis. La secuencia de aminoácidos de CryIIa38 fue 96% idéntica a la de CryIIa7. La actividad insecticida se evaluó frente a larvas de primer estadio de *O. nubilalis*, *G. molesta*, *M. brassicae* y *S. littoralis*, a 1000 ng / cm² similarmente a CryIIa38. La actividad citotóxica a cuatro concentraciones diferentes (0,16, 0,8, 4 y 20 µg / ml) también fue evaluada contra dos líneas celulares de insectos, Sf21 y Hi5.

Cuarta parte: Estudio de la oligomerización en el modo de acción de las proteínas CryIIa

- **Marcaje de CryIIa con biotina**

La proteína CryIIa activada se marcó utilizando kit para marcaje con biotina de GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), siguiendo las instrucciones del fabricante, como describió Hernández-Martínez *et al.* (2014).

- **Ensayos de oligomerización con células Sf21.**

Los ensayos de oligomerización se realizaron según lo descrito por Portugal *et al* (2014) con ligeras modificaciones. En resumen, 100 μ l de suspensión celular (2×10^6 células / ml) se trató con toxinas activadas (CryIIa biotinilada y CryIAb) a una concentración final de 0,03 μ g proteína / μ l. Las placas se incubaron durante 3 horas a 25 ° C. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación a $16.200 \times g$, 4 ° C durante 15 minutos, se lavaron con 200 μ l de tampón de carbonato 50 mM pH 10.5 y se recuperaron tras centrifugación durante 45 min a $18.800 \times g$. Las células se resuspendieron en 10 μ l de tampón y se calentaron a 50 °C, 3 minutos. Las proteínas presentes en la muestra se separaron por SDS-PAGE al 10% y se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó o/n en PBS con Tween 20 al 0,1% (PBST) suplementado con leche desnatada al 5% con agitación suave. Tras tres lavados con PBST, la membrana se incubó con anticuerpos: CryIAb se detectó con anticuerpo policlonal anti-Bt CryIAb / IAc de conejo (Abraxis Warminster, Pennsylvania, Estados Unidos) (1: 10.000, 60 min) de seguido de anticuerpo secundario (1: 20,000; 60 min) acoplado con con peroxidasa de rábano picante (HRP) mientras que la proteína CryIIa biotinilada fue detectada con HRP conjugada con estreptavidina (1: 2.000; 60 min). Ambas proteínas CryIAb y CryIIa se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECLTM (GE Healthcare) y el analizador de imágenes ImageQuant LAS400. Cada ensayo de oligomerización se repitió al menos tres veces.

- **Ensayos de oligomerización con BBMV.**

Los ensayos se realizaron siguiendo Ocelotl *et al* (2015) con algunas modificaciones: 2 μ g de CryIIa marcada con biotina o CryIAb activada se incubaron, durante una hora con 5 μ g de BBMV de *L. botrana* o *L. decemlineata*, o con 20 μ g de BBMV de *O. nubilalis*, a 37 ° C, en un volumen final de 50 μ l. Proteínas activadas

incubadas en ausencia de BBMV y muestras que contenían solo BBMV, se usaron como controles. El resto del experimento se llevó a cabo como se ha expuesto en la sección anterior. Los ensayos se repitieron, al menos, tres veces.

Quinta Parte: Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas de Bt

El efecto inhibitor de las cepas de Bt se evaluó frente al hongo fitopatógeno, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*, y a la bacteria *Erwinia sp.* La presencia de genes de endo y exoquitinasas se investigó por PCR utilizando dos pares de cebadores específicos. La actividad antibacteriana contra *Erwinia sp.* se analizó usando el método de difusión descrito por Djenane *et al.*, (2017). La actividad antifúngica de las cepas Bt contra *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* se estudió utilizando el método de cultivo dual (Knaak *et al.*, 2007).

Sexta Parte: Determinación de los cambios bioquímicos y fisiológicos provocados por Bt en las células vegetales

- Mantenimiento de las plantas de tomate e inoculación bacteriana

Plantas de tomate, *Solanum lycopersicum* L., (cultivar Falat), se desarrollaron y mantuvieron en condiciones controladas ($25 \pm 5^\circ\text{C}$, 16:8 horas (L/O), $65 \pm 5\%$ RH) en invernaderos, en suelo estéril autoclavado. Plántulas de tomate de dos semanas se transfirieron a macetas (dos plantas por tiesto) y se regaron diariamente con agua. Las plantas de seis semanas se dividieron en cuatro grupos: 1. Inoculación de la rizosfera, 2. Controles que recibieron agua destilada estéril en la rizosfera, 3. Inoculación de filoplano y 4. Controles cuyo filoplano fue rociado con agua destilada estéril. En dos tratamientos, las plantas se pulverizaron o inocularon con mezclas de esporas y cristales de la cepa AzLp. La inoculación de la rizosfera se hizo con pipetas, añadiendo 5 ml de una suspensión de 108 esporas / ml cerca de las raíces. En el tratamiento de pulverización, el suelo se cubrió con plástico para evitar la transferencia de la suspensión de Bt al suelo, y se realizó con una suspensión de 108 esporas / ml, hasta la escorrentía. Se usaron 28 tiestos de tomate en cada tratamiento, 96 tiestos en total. Después de 0 (2 horas tras la aplicación de Bt como 0 días), 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 días después del tratamiento, se recogieron las hojas maduras, se molieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

- **Respuestas bioquímicas y fisiológicas de las plantas de tomate**

Las actividades enzimáticas catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, fenilalanina amoniaco-liasa y polifenol oxidasa y parámetros no enzimáticos (proteínas, carbohidratos, fenilalanina y contenido fenólico) se determinaron y compararon en hojas de plantas tratadas y no tratadas.

Para medir las actividades enzimáticas, se homogeneizaron 0,5 g de hojas en 1 ml de tampón de fosfato 50 mM pH 6,8, seguido de centrifugación a 13000 x g 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de catalasa (Aebi 1984), superóxido dismutasa (Beauchamp y Fridovich, 1971), ascorbato peroxidasa (Ranieri *et al.*, 2003) y polifenol oxidasa (Kar y Mishra, 1976). La actividad de la fenilalanina amoniaco-liasa se midió siguiendo el protocolo de Wang *et al.* (2006).

El contenido de prolina se determinó mediante el uso de ninhidrina ácida (Carillo y Gibon, 2011). La estimación del contenido fenólico total se realizó mediante el uso de reactivo Folin-Ciocalteu (Ainsworth y Gillespie, 2007). El contenido de proteína y el hidrato de carbono total soluble se midieron como se describe en Bradford (1976) y Dreywood (1946), respectivamente.

Resultados y Discusión

Primera parte: Caracterización de cepas iraníes de *B. thuringiensis*

En este estudio se utilizaron 130 cepas de Bt: 88 procedentes de una colección de Bt del Laboratorio de Control Biológico de la Universidad de Teherán, y 42 aisladas de muestras de suelo y larvas de insectos infectados recogidos de localizaciones ambientalmente diversas en Irán.

Se realizaron pruebas preliminares de selección con mezclas de esporas y cristales usando larvas de segundo estadio de *P. intempunctella*. En base a estos resultados, las 130 cepas de Bt se clasificaron en función de su toxicidad en tres grupos de virulencia: alto, medio y bajo. Cinco cepas de Bt aisladas de larvas infectadas (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp), así como otras dos cepas de Bt aisladas del suelo (DCf y MCh), se clasificaron en la primera categoría, causando una mortalidad de más del 67%. La mayoría de las cepas (119 cepas de Bt) no causaron mortalidad significativa (menos del 34%) y solo cuatro cepas mostraron actividad moderada (34% a 67% de mortalidad). A partir de estos resultados, siete cepas de Bt con diversa actividad larvicida (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp, altamente tóxicas y las cepas KhF y RM Bt que mostraron actividad respectivamente baja y no tóxica) fueron seleccionadas y caracterizadas con más detalle en este trabajo.

El espectro de actividad tóxica se evaluó mediante bioensayos usando el método de contaminación superficial, utilizando larvas de primer estadio de los lepidópteros *S. exigua*, *M. brassicae*, *G. molesta* y *O. nubilalis* (que representan las familias Noctuidae, Tortricidae, Crambidae y Pyralidae de orden Lepidoptera) a una concentración de 1000 ng/cm². *G. molesta* y *O. nubilalis*, fueron los insectos más susceptibles tanto a las protoxinas como a las toxinas activadas. Diversos grados de mortalidad se observaron cuando se usaron larvas de *S. exigua* y *M. brassicae*. Entre ellos, las protoxinas y las toxinas activadas de AzLp, IE-2 e IP-2 exhibieron los niveles más altos de toxicidad para estos dos insectos en comparación con las del estándar Bt HD-1.

Para completar el análisis toxicidad, se realizaron ensayos *in vitro* con líneas celulares de lepidópteros (actividad citotóxica) de la familia Noctuidae. Las proteínas cristalinas de AzLp, IE-2 e IP-2 fueron las más tóxicas para todas las líneas celulares, especialmente para Sf21. Los ensayos *in vitro* indicaron que las cepas IE-1 y RM fueron

poco tóxicas para todas las líneas celulares analizadas, similarmente a la cepa de referencia HD-1. Además, después de exponer las células Sf21 a diferentes concentraciones de toxinas activadas de AzLp IE-2 e IP-2, se observaron cambios morfológicos, como hinchado osmótico o células con forma de globo. El resultado de los ensayos mostró que al aumentar la concentración de toxina, la viabilidad de las células disminuía. Las cepas IE-2 e IP-2 exhibieron una actividad citotóxica estadísticamente similar, con EC50 de 1,03 y 1,60 µg / ml, respectivamente.

Nuestros resultados mostraron que las cepas Bt seleccionadas presentaban perfiles proteicos similares en SDS-PAGE, compuestos por proteínas con pesos moleculares entre 130 y 20 kDa. Los perfiles de bandas fueron, generalmente, similares al de Bt HD-1 y consistieron principalmente en dos bandas de aprox. 130 (que podrían corresponder a proteínas de tipo Cry1) y sobre 65 kDa (probablemente correspondiente a proteínas de tipo Cry2 o Cry1 procesada). Tras la solubilización, las proteínas activadas con tripsina mostraron perfiles de bandas en prácticamente idénticos, evidenciando dos bandas mayoritarias de alrededor de 65 kDa.

El análisis proteómico por LC-MS / MS mostró que las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da y Cry2Aa eran las más abundantes en los cristales de las cepas Bt seleccionadas. Las proteínas de la familia Cry1A fueron las más abundantes según los valores cuantitativos. Cry1Ac fue la única proteína asignada a la cepa RM. Para la cepa KhF, no se identificó ninguna proteína similar a las proteínas cristalinas insecticidas Bt conocidas.

El análisis de PCR se llevó a cabo para identificar los genes codificantes para proteínas Bt, tanto las secretadas durante la etapa vegetativa de Bt (genes *cryII*, *vip* y *sip*) como las presentes en los cristales (genes *cry*, *cyt* y *ps*). Se observó que el gen *cry2* estaba presente en todas las cepas probadas. Excluyendo KhF, las otras cepas produjeron los amplicones esperados en base a los resultados obtenidos en anteriormente. Las cepas IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp mostraron amplificación por PCR positiva para los genes *cry1Ac*, *cryII*, *vip3*. En ninguna de las cepas se amplificaron los genes *cry1Ad*, *cry1Ag*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1*, *vip2*, *sip1*, *ps1*, *ps2*, *ps3* o *ps4*.

Como paso final en la caracterización, se investigó la producción de β-exotoxina, requisito necesario para proponer una nueva cepa de Bt como candidato para uso

comercial. La β -exotoxina es tóxica para vertebrados, por lo que los bioinsecticidas basados en Bt que la producen están prohibidos. La presencia de β -exotoxina se determinó por LC-MS / MS en el sobrenadante del cultivo de Bt en fase vegetativa. Los resultados mostraron su ausencia en todas las cepas Bt seleccionadas, clasificándolas como aptas para futuros bioplaguicidas.

En resumen, de un total de 130 cepas iraníes de Bt, 7 fueron seleccionadas para ser extensivamente caracterizadas empleando diferentes metodologías. Como resultado, debido a la alta toxicidad para diferentes larvas y líneas celulares de insectos, la presencia de proteínas insecticidas y la ausencia de β -exotoxina, las cepas AzLp, IE-2 e IP-2 se pueden proponer como candidatas para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas basados en Bt.

Segunda Parte: Aislamiento, clonación, expresión y purificación de nuevas proteínas insecticidas

Debido a la extensa aplicación de productos basados en Bt, en algunos insectos plaga se han detectado brotes de resistencia. Se han empleado diversas estrategias para mejorar la eficacia de los insecticidas basados en Bt y el descubrimiento de nuevas cepas es necesario para descubrir nuevas toxinas con diferentes modos de acción y quizás un rango más amplio de actividad insecticida. En esta Tesis, en la búsqueda de nuevos genes *cry* que codifiquen nuevas toxinas, en la cepa IE-1 se encontró un nuevo gen tipo *cryIIa*. Fue llamado *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Number MG584186), y se observó que tenía 2160 pb que codificaban una proteína de 719 aminoácidos. Éste gen se clonó a partir del ADN genómico extraído de la cepa IE-1 y se expresó en células de *E. coli* BL21. El gen codificó para una proteína de 80 kDa, masa molecular única entre las proteínas cristalinas de 3 dominios y común a todas las toxinas CryII. La activación dió como resultado un péptido estable de aprox. 50 kDa.

Posteriormente se comparó la toxicidad de CryIIa38 con la de un mutante puntual de ésta generado mediante mutagénesis dirigida, el CryIIa38-II16V, que tiene sustituida Ile por Val en la posición 116, en el dominio I de la proteína. La expresión de CryIIa38-II16V resultó en una protoxina de 80 kDa, que tras activarla se mostró como una banda de 50 kDa en SDS-PAGE.

Tercera parte: Investigación de las propiedades insecticidas y citotóxicas de las toxinas Cry1Ia

Los bioensayos mostraron que la protoxina Cry1Ia38 era altamente tóxica para *O. nubilalis* y *G. molesta*, poco tóxica para *S. exigua* y *S. littoralis*, e inocua para *H. armigera*. La proteína Cry1Ia38 activada, resultó altamente tóxica para *G. molesta* y moderadamente tóxica *O. nubilalis*. En base a los ensayos de viabilidad celular, Cry1Ia38 (protoxina o toxina) no fue tóxica para las células Sf21 a las concentraciones probadas.

La actividad insecticida de la protoxina y la proteína tripsinizada de Cry1Ia38-I116V, se determinó frente a larvas de *O. nubilalis*, *G. molesta* y *S. exigua* y *S. littoralis* a una concentración de 1000 ng / cm². La protoxina resultó tóxica para *O. nubilalis* y *G. molesta*, mientras que el mutante activado con tripsina perdió la toxicidad contra ambos insectos. Por lo tanto, los datos indican que la mutación afectó la actividad insecticida. De forma similar a lo que se había encontrado con Cry1Ia38, la protoxina y la toxina activada de Cry1Ia38-I116V no resultaron tóxicas para las células Sf21.

La caracterización molecular y las actividades insecticidas y citotóxicas de Cry1Ia7 se analizaron y compararon con las proteínas obtenidas en el presente trabajo, Cry1Ia38 y Cry1Ia38-I116V. Nuestros resultados mostraron que la protoxina de Cry1Ia7 era tóxica para *O. nubilalis* y *G. molesta*. Pero la toxina activada dio una toxicidad menor que la de Cry1Ia38 para *G. molesta*. El ensayo de viabilidad celular mostró que Cry1Ia7 no era tóxica para las células Sf21 o Hi5 a las concentraciones probadas (no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas). Solo después de 48 horas de exposición a la concentración más alta de Cry1Ia7 activada (20 µg / ml), se observó una pérdida del 40% de la viabilidad celular en ambas líneas celulares.

En resumen, en esta investigación se evaluó y comparó el espectro insecticida de diferentes proteínas Cry1Ia. De acuerdo con nuestros hallazgos, las protoxinas de Cry1Ia38 y Cry1Ia7 fueron tóxicas para las larvas de *O. nubilalis* y *G. molesta*. Pero la Cry1Ia7 activada con tripsina no mostró actividad insecticida contra las larvas de *G. molesta*, mientras que Cry1Ia38 sí lo hizo. Tomados en conjunto, aunque existe una alta identidad entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry1Ia probadas, se detectaron diferencias significativas en la actividad insecticida de las formas activadas por tripsina de estas toxinas, en particular, contra *G. molesta*.

Cuarta parte: Estudio de la oligomerización en el modo de acción de las proteínas CryIIa

El modo de acción de las toxinas Cry de Bt comienza por la ingestión de las inclusiones cristalinas paraesporales y su solubilización (por las condiciones de pH del intestino medio del insecto), convirtiéndolas en protoxinas. Éstas son activadas por las proteasas del intestino medio del huésped, produciendo núcleos resistentes a proteasas o toxinas. El modo de acción de las proteínas Cry de 3-dominios que componen el cristal paraesporal de Bt, no está totalmente dilucidado. De acuerdo con el modelo de unión secuencial, después de esta activación proteolítica, en el intestino los monómeros se unen a receptores de membrana tipo cadherina. Esta unión desencadena un segundo corte proteolítico que favorece la oligomerización de toxinas, y tras ello, su inserción en las membranas intestinales y la formación de poros. La formación de un oligómero antes de la inserción en membrana se ha descrito como un paso importante necesario para el proceso de toxicidad. Debido a las características específicas de las proteínas CryII (las cuales tienen 3 dominios pero no forman cristal), una mejor comprensión de su modo de acción es fundamental para mejorar su eficacia frente a las plagas de insectos. En este estudio, se ha determinado por primera vez la formación de oligómeros de CryIIa y la posible relación entre éstos y su actividad insecticida.

Dado que las proteínas CryII tienen actividad doble contra las plagas de lepidópteros y coleópteros, se estudió la formación de oligómeros de CryIIa7 después de incubar la proteína con BBMV del coleóptero susceptible *L. decemlineata*, del lepidóptero susceptible *L. botrana*, y del lepidóptero no susceptible *O. nubilalis*. Además, en este estudio se empleó la línea celular Sf21 como modelo derivado de células. Además, se seleccionó CryIAb como control debido a que su oligomerización ha sido demostrada en varios estudios. Nuestros resultados mostraron claramente que CryIAb puede oligomerizar en la forma de tetrámero propuesta por otros autores (tamaño de peso molecular de 250 kDa) tras entrar en contacto con BBMV o células de insectos independientemente de la susceptibilidad del huésped, ya que se observaron oligómeros después de la incubación de la proteína tripsinizada con BBMV de *O. nubilalis* o *L. botrana* (insectos susceptibles), pero también con BBMV de *L. decemlineata* (no susceptible) y células Sf21 (células no susceptibles). Pero la toxina CryIIa formó oligómeros solo después de la incubación con BBMV de *L. decemlineata* (coleóptero

susceptible) pero no después de la incubación con BBMV de lepidópteros o células, independientemente de su susceptibilidad. En base a nuestros resultados, el modelo de unión secuencial del modo de acción de las toxinas de Bt de tres dominios, que incluye la oligomerización, puede no ser general para todos los miembros de la familia Cry de tres dominios. Estos datos indican que posiblemente Cry1Ia tenga un modo de acción diferente a otras proteínas Cry, favoreciendo que puedan usarse en combinación con éstas últimas en insecticidas o plantas transgénicas, para retrasar la evolución de la resistencia en los insectos diana.

Quinta Parte: Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas de Bt

Hasta ahora, solo las propiedades insecticidas de Bt atraían atención. Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto otras acciones de Bt en el control de enfermedades de las plantas, ya que existen evidencias de una acción antibiótica de esporas y cristales de cepas de Bt sobre hongos y bacterias fitopatógenas. Encontrar una formulación basada en Bt específica, fácilmente degradable y de bajo coste para controlar tanto las plagas de insectos como las enfermedades de las plantas, sería altamente valiosa en el control biológico.

En esta Tesis, se evaluó la actividad antimicrobiana de las siete cepas de Bt previamente seleccionadas, contra patógenos de plantas tales como el hongo *F. oxysporum* o la bacteria *Erwinia sp.* Además, se estudió el gen de quitinasa como un importante agente antifúngico en las cepas de Bt estudiadas.

Nuestros resultados mostraron que las cepas IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp poseen exoquitinasa. El gen de la endo-quitinasa se detectó en las cepas AzLp, IE-2 e IP-2. La actividad antifúngica de las siete cepas Bt se evaluó por el método de cultivo dual frente a *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* que causa podredumbre de la raíz en plantas de tomate. El fitopatógeno creció en la superficie de placas de Agar de Dextrosa de Patata y las barreras bacterianas de Bt no inhibieron su crecimiento. Como resultado, se concluyó que la mezcla de esporas y cristales de las cepas de Bt seleccionadas no poseían actividades antifúngicas. No se observó correlación entre la presencia de genes de quitinasa y la actividad antifúngica, lo que podría explicarse por una baja transcripción del gen o por secuencias no transcritas.

La actividad antibacteriana de las cepas Bt seleccionadas se probó por el método de difusión en agar, frente a la bacteria patógena Gram negativa, *Erwinia sp.*. La bacteria fitopatógena creció en toda la superficie de la placa de Agar Nutritivo y no se observaron zonas claras alrededor de las colonias de Bt, lo que indica que éstas no pudieron controlar *Erwinia sp.*, que causa la enfermedad de pudredumbre blanda del tomate. La actividad antimicrobiana descrita en otras cepas de Bt podría ser una consecuencia de la adaptación de dichas cepas a su hábitat. Por lo tanto, debido a que la mayoría de las cepas de Bt estudiadas (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp) habían sido aisladas de larvas de insectos infectados o muertos, lo más probable es que no mostraran ninguna actividad antimicrobiana contra los agentes fitopatógenos utilizados en este estudio, usualmente presentes en el suelo (*F. oxysporum* subsp *lycopersici* y *Erwinia sp.*).

Sexta Parte: Determinación de los cambios bioquímicos y fisiológicos provocados por Bt en las células vegetales

Se ha descrito que cepas Bt tienen potencial para promover el crecimiento de las plantas, mejorar la absorción de nutrientes y protegerlas en condiciones de estrés abiótico y biótico. Bt puede proteger las plantas a través de la producción de sideróforos, actividad quitinasa, aumentando las actividades de las enzimas de resistencia de las plantas e induciendo la resistencia sistémica. Aunque los pesticidas basados en Bt se han usado ampliamente durante años, se sabe muy poco sobre la interacción entre las células vegetales y Bt. El objetivo de esta parte de la tesis fue estudiar la interacción planta-Bt a nivel celular, centrándonos en el efecto de la inoculación de Bt sobre el estado antioxidante de la planta.

Cuando las plantas están sujetas a estrés biótico o abiótico, hay una producción de especies reactivas de oxígeno que dañan sus células. Por lo tanto, enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa, fenilalanina amoniaco-liasas y ascorbato peroxidasa son necesarias para eliminar dichas especies reactivas y restaurar las condiciones normales a nivel celular. Cuando las plantas sufren estrés biótico (como invasión de patógenos), se producen las reacciones oxidativas (superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) que desencadenan la defensa de la planta en dos fases; la fase uno es inespecífica y ocurre inmediatamente después del reconocimiento del patógeno, pero la fase dos se prolonga y conduce a la resistencia a la enfermedad. En este

trabajo de Tesis, se estudió la actividad de los enzimas antioxidantes tras tratar plantas de tomate (rociando el filoplano o inoculando la rizosfera) con las cepas de Bt seleccionadas. El resultado fue un aumento significativo de dichas actividades, muy probablemente para reducir el estrés oxidativo. En el caso de tratar (en filoplano o rizosfera) las plantas de tomate con una mezcla de esporas y cristales de la cepa AzLp, se observaron estas dos fases.

El tratamiento de plantas de tomate con suspensión de Bt (mezcla de esporas y cristales) tanto en filoplano como en rizosfera, mejoró significativamente la acumulación de proteínas, carbohidratos, prolina y contenido fenólico en hojas de tomate en comparación con el tratamiento no inoculado. Los componentes no enzimáticos, como la prolina, actúan como una defensa principal contra las especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, al aumentar los contenidos fenólicos, de carbohidratos, proteínas y prolina en las hojas de tomate, se disminuye el daño oxidativo. En conjunto, de acuerdo con nuestras observaciones, el impacto de la suspensión de Bt en las células de tomate condujo a respuestas fisiológicas y bioquímicas, que aumentaron la actividad de las enzimas antioxidantes y la resistencia inducida al estrés biótico.

En resumen, nuestra investigación ha caracterizado extensivamente algunos aislados de Bt iraníes seleccionados según su toxicidad a *P. interpunctella*, mediante el uso de diferentes técnicas complementarias. La caracterización se realizó en base al perfil electroforético de proteínas, contenido de genes, análisis proteómico, perfil insecticida y citotóxico y producción de β -exotoxina. Esta caracterización integral ha revelado tres cepas Bt muy potentes para controlar plagas de lepidópteros. Siguiendo los objetivos de esta tesis, el efecto de las proteínas de las cepas de Bt seleccionadas se evaluó usando células animales (líneas celulares de insectos), células microbianas (cultivos de *Erwinia sp.* y *Fusarium*) y células vegetales (plantas de tomate). Para encontrar nuevas actividades insecticidas, se exploraron las cepas seleccionadas en busca de nuevos genes *cry*. Como resultado, se descubrió el gen *cryIIa38*, y tanto éste como un mutante puntual de éste, se clonaron y expresaron. Las actividades insecticidas y citotóxicas de las proteínas CryII se evaluaron frente a diferentes especies de lepidópteros y líneas celulares de insectos. Los resultados de nuestros bioensayos mostraron que CryIIa38 en forma de protoxina o de toxina activada, tiene un gran potencial para controlar *O. nubilalis* y *G. molesta*. Finalmente, se realizaron estudios de biología molecular para estudiar la oligomerización

de la proteína Cry1Ia. Nuestros hallazgos mostraron que la oligomerización no es un paso necesario en la toxicidad de estas proteínas.

Conclusiones:

- Se ensayó la actividad insecticida de 130 cepas de Bt iraníes aisladas de diferentes hábitats, contra larvas de segundo estadio de *P. interpunctella*. Sólo 7 cepas (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, DCf y MCh) fueron activas contra esta plaga.
- Para estudiar y predecir la potencia insecticida de las nuevas cepas de Bt, se llevaron a cabo diferentes tipos de caracterización complementarios: ensayos de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, perfiles proteicos por SDS_PAGE, análisis proteómico, identificación de contenido génico y producción de β -exotoxina.
- Debido a la alta toxicidad frente diferentes lepidópteros y líneas celulares, la presencia de las proteínas insecticidas, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca y Cry1Da, y la ausencia de β -exotoxina, AzLp, IE-2 e IP-2 fueron propuestas como candidatas adecuados para el desarrollo de futuros insecticidas basados en Bt.
- Las cepas Bt estudiadas (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, RM y KhF), no pudieron controlar la bacteria patógena de plantas *Erwinia sp.*
- Las cepas IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 e IEp poseen exoquitinasa y el gen de endoquitinasa se observó en las cepas AzLp, IE-2 e IP-2 Bt. Sin embargo, la mezcla de esporas y cristales de las cepas Bt no mostraron actividad antifúngica contra *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. No se observó correlación entre la presencia de genes de quitinasa y la actividad antifúngica.
- La inoculación o rociado de las plantas de tomate con AzLp redujo el estrés oxidativo a través de un aumento significativo de las actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, fenilalanina amoniaco-liasa y ascorbato peroxidasa).
- La inoculación o rociado de las plantas de tomate con suspensiones de esporas y cristales de Bt mejoró significativamente la acumulación de proteínas, carbohidratos, prolina y contenido fenólico en las hojas de tomate.
- El impacto de Bt en las células de tomate condujo a respuestas fisiológicas y bioquímicas, y finalmente aumentó la actividad de enzimas antioxidantes y

la resistencia sistémica inducida en las plantas frente a posibles invasiones de fitopatógenos.

- El gen *cryIIa38* se aisló de la cepa IE-1 y se clonó y expresó con éxito en células de *E. coli*.
- CryIIa38 tiene un gran potencial para controlar *O. nubilalis* y *G. molesta*.
- La protoxina de CryIIa38-II16V, generada por mutagénesis dirigida, resultó tóxica para *G. molesta*, mientras que la proteína activada perdió su toxicidad hacia esta plaga.
- La protoxina de CryIIa7 resultó tóxica para *O. nubilalis* y *G. molesta*. Después de 48 horas de exposición a la concentración más alta de CryIIa7 activada (20 µg / ml), se observó una pérdida del 40% de la viabilidad celular en las líneas celulares Sf21 e Hi5.
- Se detectaron por primera vez oligómeros de CryIIa, pero sólo después de su incubación con BBMV de *L. decemlineata* (coleóptero susceptible). No se encontró estructura oligomérica tras incubación con BBMV de lepidópteros o con células Sf21, independientemente de su susceptibilidad. Por lo tanto, parece que la oligomerización, puede no formar parte del modo de acción de las proteínas CryIIa.

Referencias

1. **Aebi, H.** 1984. Catalase *in vitro*. Methods. Enzymol. 105: 121-126.
2. **Ainsworth EA. And Gillespie.** 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nature Protocols 2(4):875-878.
3. **Beauchamp C. and Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276-287.
4. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of dye-binding. Anal Biochem 72:248–254.
5. **Carillo, P., Gibbon, Y.,** 2011. Protocol: Extraction and Determination of Proline. Prometheus Wiki01/2011. <http://www.researchgate.net/publication/211353600> PROTOCOL Extraction and determination of proline.
6. **Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H and Ferré J.** 2017. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. Toxins 9:139-158.
7. **Dreywood R.** 1946. Qualitative test for earbohydrate material. Industrial attd Engineeritig Chemistry - Atialytical Edition 18, 499.
8. **Escriche B, Silva FS, Ferré J.** 1995. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal protein. J. Invertebr. Pathol. 65:318–320.
9. **Estela A, Escriche B, Ferré J.** 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl Environ Microbiol 70:1378–1384.
10. **Ferrandis MD, Juárez-Pérez VM, Frutos R, Bel Y, Ferré J.** 1999. Distribution of cryI, cryII and cryV Genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. Syst Appl Microbiol 22:179–185.
11. **Hernández CS, Martínez C, Porcar M, Caballero P, Ferré J.** 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. J Invertebr Pathol 82:57-62.
12. **Hernández-Martínez P., Vera-Velasco NM., Martínez-Solís M., Ghislain M., Ferré J. and Escriche B.** 2014. Shared binding sites for the *Bacillus thuringiensis*

- proteins Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa in the African sweet potato pest *Cylas puncticollis* (Brentidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 80(24): 7545-7550.
13. **Hernández-Martínez, P., Ferré, J., and Escriche, B.** 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 245–250.
 14. **Kar, M. and Mishra, D.** 1975. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
 15. **Khorramnejad A., Bel Y., Hernández-Martínez P., Talaei-Hassanloui R. and Escriche B.** 2018. Insecticidal activity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia protein. *GMOs in Integrated Plant Protection IOBC-WPRS Bulletin.* 131: 56-63.
 16. **Knaak, N. Rohr, A.A. and Fiuza, L.M.** *In vitro* effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* 2007, 38, 526–530.
 17. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
 18. **Martínez, C., M. Porcar, A. López, I. Ruiz de Escudero, F. J. Pérez-Llarena, & P. Caballero.** 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol. Exp. Appl.* 111:71-77.
 19. **Ocelotl J., Sánchez J., Arroyo R., Gracia-Gómez BI., Gómez I., Unnithan GC., Tabashnik BE., Bravo A. and Soberón M.** 2015. Binding and oligomerization of modified and native Bt toxins in resistance and susceptible pink bollworm. *PlosOne* 10 (12).
 20. **Portugal L., Gringorten JL., Caputo GF., Soberón M., Muñoz-Garay C. and Bravo A.** 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides* 53:292-299.
 21. **Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. and Soldatini, GF.** 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54: 2529-2540.
 22. **Sayed, A.H., Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M., Escriche, B., Wright, D.J., Crickmore, N.,** 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella*

xylostella to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. Appl. Environ. Microbiol. 11, 6863–6868.

23. **Wang, WJ., Zheng, LP., Wu, JY. And Tan, RX.** 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxusyunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.
24. **Wolfersberger MG, Luthy P, Parenti P, Parenti P, Sacchi VF, Giordana B, Hanozet GM.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 86A:301–308.



University of Tehran
College of Agriculture & Natural Resources
Plant Protection Department



Universitat de València
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Genètica

Diversitat estructural i funcional de les toxines de *Bacillus thuringiensis* i el seu efecte en animals, plantes i cèl·lules microbianes

Tesis realitzada per

Ayda Khorramnejad

Directors

Dr. Reza Talaei-Hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Dra. Yolanda Bel Cortés

Programa de Doctorat de Biotecnologia i Biomedicina
Universitat de València

Novembre 2018

Resum

Bacillus thuringiensis (Bt) és un dels agents entomopatògens de més èxit en el control biològic de plagues. La identificació de noves soques és important per descobrir noves toxines de Bt que ampliïn la gamma d'activitats insecticides i poder gestionar el problema de l'aparició de resistència als insectes plaga. Per això, soques iranianes de Bt es van analitzar, comprovant la seva toxicitat contra *Plodia interpunctella*. Es va seleccionar un grup de soques amb diversa activitat larvicida i es van caracteritzar en profunditat d'acord amb el seu contingut de gens, composició de proteïnes, l'espectre d'activitat insecticida contra lepidòpters plaga i contra línies cel·lulars d'insectes, la producció de β -exotoxina, l'activitat antimicrobiana i els efectes bioquímics sobre les cèl·lules vegetals. Com a resultat, les soques AzLp, IE-2 i IP-2 Bt es van proposar com a candidats per al desenvolupament de nous bioinsecticides. La inoculació de plantes de tomàquet amb barreges d'espores i cristalls de les soques de Bt seleccionades, va provocar un augment l'activitat d'enzims antioxidants i va induir resistència enfront de probables invasions de patògens i l'estrès biòtic i abiòtic, però no va induir activitats antimicrobianes contra fitopatògens tals com el fong *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* i / o el bacteri *Erwinia* sp.

L'anàlisi del contingut de gens de les soques de Bt amb més capacitat insecticida va conduir a l'aïllament del gen *cryIIa38* de la soca IE-1. Posteriorment, el gen es va clonar i expressar. Els nostres resultats mostren que la proteïna CryIIa38 té un gran potencial per controlar *Ostrinia nubilalis* i *Grapholita molesta*. A causa de les característiques particulars de les proteïnes CryII, es va investigar la possible formació d'una estructura oligomèrica i la seva possible associació amb l'activitat insecticida d'aquesta proteïna. Segons els nostres resultats, sembla que la oligomerització no és un procés generalitzat entre les toxines CryIIa.

Paraules clau: *Bacillus thuringiensis*, línies de cèl·lules d'insectes, LC-MS / MS, proteïnes CryIIa, formació d'oligomers, activitat antimicrobiana, resposta bioquímica de plantes.

Antecedents

A causa dels efectes nocius dels insecticides químics en els ecosistemes i sobre els organismes beneficiosos, la implementació d'agents de control biològic ha rebut considerable atenció. Entre els agents de control biològic, s'ha dedicat gran interès als entomopatògens, per la seva potencialitat per controlar plagues agrícoles i domèstiques, vectors de malalties humanes i animals, sense introduir material no degradable en el medi ambient. *Bacillus thuringiensis* (Bt) és l'agent de control microbià comercial més utilitzat en l'actualitat, amb efectivitat contra diferents espècies d'insectes plaga. Les diferents soques de Bt produeixen, durant la fase d' esporulació del creixement bacterià, cristalls paràsporals compostats de proteïnes, anomenades δ -endotoxines o proteïnes Cry (de cristall). A més, aquest bacteri, durant la fase de creixement vegetatiu, produeix un altre tipus de proteïnes insecticides, a saber, CryII, Vip i Sip. Les proteïnes CryII no formen part del cristall Bt, però també s'anomenen "Cry" perquè comparteixen, amb la majoria de les proteïnes de cristall, una estructura de 3 dominis. Les proteïnes insecticides Cry de Bt són altament selectives, no tòxiques per als vertebrats i ràpidament degradables. A causa d'aquestes característiques, Bt ha guanyat una gran importància en el control de plagues d'insectes agrícoles i molts estudis s'han centrat, en el passat i present, en l'aïllament i la caracterització de nous ceps que puguin conduir a trobar noves toxines amb un espectre d'activitat més ampli i major toxicitat insecticida.

Objectius

La importància de Bt en el control biològic de plagues, va fer que aquesta Tesi tingués els següents objectius:

- Caracterització dels aïllats de Bt iranians
- Expressió, aïllament i purificació de noves proteïnes insecticides com CryIIa
- Avaluació de l'activitat insecticida i citotòxica de les toxines CryIIa
- Estudi del pas d'oligomerització en el mode d'acció de les proteïnes CryIIa
- Avaluació de l'activitat antimicrobiana de les soques Bt
- Determinació dels efectes bioquímics de les soques Bt sobre les cèl·lules vegetals

Segons aquests objectius, la tesi s'ha dividit en sis parts principals que corresponen a cadascun d'ells.

Materials i mètodes

Els materials i mètodes generals utilitzats en aquest treball es descriuen a continuació. Altres metodologies específiques utilitzades en cadascuna de les sis parts principals que componen aquesta tesi es descriuen després, sota el títol de cadascuna de les parts anunciades.

- Soques bacterianes

En aquest estudi es van utilitzar un total de 130 soques de Bt iranianes que formaven part de una col·lecció de Bt al Laboratori de Control Biològic de la Universitat de Teheran. A més, la soca HD1S2005 de *B. thuringiensis* HD1 (Bt HD1) (proporcionada amablement per Valent Bioscience, Inc., Libertyville, IL, EUA) i *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD2 (Berliner) (Bt HD2, obtinguda del Bacillus Genetic Stock Center, BGSC, Ohio State University, Ohio, EUA), es va utilitzar com a soques estàndard de referència. Les soques d'*Escherichia coli* DH α 5 i BL21 (DE3) es van utilitzar com a cèl·lules competents per a la clonació gènica i l'expressió de proteïnes.

- Crija d'insectes

En aquesta investigació es van utilitzar vuit espècies diferents de lepidòpters i una plaga de coleòpters, per realitzar els bioassaigs i els assaigs de formació d'oligòmers. Entre les espècies d'insectes lepidòpters que es van utilitzar per realitzar els experiments de bioassaigs, estan *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *Mamestra brassicae* i *Helicoverpa armigera* pertanyen a la família Noctuidae, *Grapholitamolesta*, *Plodia interpunctella* i *Ostrinia nubilalis* de les famílies de Tortricidae, Pyralidae i Crambidae, respectivament. *Lobesia botrana* (Tortricidae), *O. nubilalis* i un coleopter; *Leptinotarsa decemlineata* de la família Chrysomelidae, van ser seleccionats per a la obtenció i preparació de vesícules de membrana intestinal, per la realització dels assaigs de formació d'oligòmers. Totes les colònies d'insectes van ser criades en la dieta artificial i mantingudes a 25 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ RH i amb un fotoperíode L: D de 16: 8.

- Línies cel·lulars d'insectes

Es van utilitzar quatre línies de cèl·lules d'insectes en aquest estudi: BTI-Tn-5B1-4 (Hi5), obtingudes a partir de cèl·lules ovàriques de *Trichoplusia ni*, RP-HzGUTAW1 (HzGUT) obtingudes a partir de cèl·lules intestinals d'*Helicoverpa zea*, UCR-SE, de *S. exigua* i cèl·lules Sf21, obtingudes de cèl·lules dels ovaris de *S. frugiperda*. Les línies cel·lulars d'insectes es van cultivar en un mitjà adequat de cultiu cel·lular i es van mantenir sota les condicions recomanades pel proveïdor (Laboratori de Virologia, Universitat de Wageningen, Països Baixos).

- Preparació de vesícules de membrana intestinal (BBMV)

Les vesícules de membrana intestinals (BBMV) van ser purificades a partir de intestins obtinguts de larves d'últim estadi larvari d'*O. nubilalis* i *L. decemlineata* i d'insectes sencers (larves d'últim estadi larvari) de *L. botrana*. Per obtenir les BBMV, es va aplicar el mètode diferencial de precipitació de magnesi (Wolfersberger et al., 1987), modificat per Escriche et al., (1995). Les BBMV purificades es van quantificar mitjançant l'assaig de Bradford i es van emmagatzemar a -80 ° C fins a l'ús.

- Solubilització de protoxina i activació de la toxina

Les soques de *B. thuringiensis* es van cultivar en un medi CCY-agar i es van incubar a 29°C durant 2 dies. La producció i la solubilització de les proteïnes del cristall es van realitzar tal com ho va descriure Estela et al. (2004). La concentració de proteïnes va ser determinada per l'assaig de Bradford (Bradford, 1976). L'activació de protoxina es va realitzar afegint 10% de tripsina (w / w) i incubant la mostra durant 2 hores a 37 ° C. Les proteïnes activades solubilitzades i tripsines van ser analitzades mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 12% de dodecilsulfat sòdic tal com es descriu en Laemmli 1970.

- Expressió, purificació i activació de proteïnes Cry clonades

La proteïna Cry1Ab (utilitzada com a control en aquest estudi), es va obtenir a partir de la soca recombinant de *E. coli* GG094-208 (del Dr. R.A. de Maagd, Universitat de Wageningen, Països Baixos). La proteïna Cry1Ia7 originalment obtinguda d'una soca espanyola de Bt, HU4-2 (Martínez et al., 2004), va ser amablement proporcionada pel Dr. Primitivo Caballero (Universitat Pública de Navarra, Pamplona, Espanya). Les proteïnes Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V i Cry1Ia7 es van expressar a les cèl·lules *E. coli*, BL21 (DE3) recombinants.

L'expressió de proteïna Cry1Ab, la purificació dels cossos d'inclusió, la solubilització i l'activació de protoxina mitjançant tripsina es va realitzar tal com s'ha descrit anteriorment (Sayyed et al., 2005). Per obtenir el fragment principal corresponent a la toxina activada de Cry1Ab, es va realitzar una cromatografia d'intercanvi anionic en una columna MonoQ 5/5 utilitzant el sistema explorador Äkta 100 (GE Healthcare, Regne Unit). Les fraccions eluïdes de la columna es van analitzar individualment mitjançant electroforesi SDS-PAGE.

L'expressió de les proteïnes Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V i Cry1Ia7 en les cèl·lules recombinants *E. coli*, BL21 (DE3), la purificació d'afinitat mitjançant una columna bruta HisTrap™ FF (GE Healthcare Bio-Sciences, Upsala, Suècia), la diàlisi de proteïnes i l'activació de protoxina per la tripsina es va realitzar segons s'ha publicat en Khorramnejad et al., (2018).

La concentració de les proteïnes Cry1Ab, Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V i Cry1Ia7 es va estimar mitjançant densitometria utilitzant la versió 12.3 del programa TotalLab Quant, emprant albúmina sèrica bovina (BSA) com a proteïna estàndard.

Metodologia específica per objectius:

Primera part: caracterització de les soques de *B. thuringiensis* de Iran

- Aïllament de soques de Bt a partir de mostres de Iran

El mètode de selecció amb acetat es va utilitzar per aïllar, inicialment, les soques Bt. Aquest mètode es basa en que l'acetat de sodi (0,25 mM) inhibeix de manera selectiva la germinació de les espores de Bt i no d'altres espores, de manera que es poden eliminar les espores germinades i també altres bacteris que no formen espores, seguint un tractament tèrmic de 7 min a 80 °C. A continuació, les mostres es van sembrar en placa (en agar nutritiu) i es van incubar 16 hores a 29 °C. Les colònies obtingudes es van examinar mitjançant tinció de Gram i es va observar la presència de cristalls paraesporals mitjançant microscòpia de contrast de fases. Els aïllats de Bt es van classificar com a tals després d'observar la seva capacitat de produir cristalls paraesporals.

-Bioassaigs

Es va realitzar una selecció preliminar de soques Bt amb capacitat insecticida enregistrant la toxicitat de les 130 soques de Bt natives contra larves de segon estadi de *P. interpunctella*. Els bioensayos es van realitzar amb una concentració exclusiva de 10^8 cèl·lules / ml (més alta que la LC_{50} calculada) contra les larves de *P. interpunctella* pel mètode d'incorporació en dieta. Els assaigs es van dur a terme utilitzant 20 larves, amb tres repeticions. L'aigua es va utilitzar com a control negatiu. La mortalitat es va registrar després de 72 hores de tractament.

Basant-se en aquest cribratge, es van seleccionar set soques de Bt amb diferents activitats larvícides i es van analitzar contra larves nounades de *S. exigua*, *G. molesta*, *O. nubilalis* i *M. brassicae*, per mètode de contaminació superficial tal com ho descriu Hernández-Martínez et al., 2008. Es van realitzar experiments amb protoxines i toxines activades, i es van repetir tres vegades, amb 48 larves en cada replicat. El tampó de solubilització i la soca HD1 es van utilitzar com a control negatiu i soca de referència, respectivament. Els bioensayos es van realitzar a 25 ± 1 ° C, $60 \pm 5\%$ RH i 16: 8 fotoperíode L / D. La mortalitat es va registrar després de 7 dies de tractament.

- Assajos de viabilitat cel·lular

La viabilitat cel·lular es va analitzar utilitzant el reactiu CellTiter 96 ® Aqueous One Solution (Promega Co, Madison, WI, EUA). La tècnica es basa en la detecció de la reacció de la sal de tetrazolium (MTT- 3- (4,5-Dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H - tetrazolium bromide). L'assaig de viabilitat cel·lular es va realitzar amb quatre línies cel·lulars procedents de *T. ni* (Hi5), *H. zea* (HzGUT), *S. exigua* (UCR-SE) i *S. frugiperda* (Sf21). L'activitat citotòxica es va investigar mitjançant observació microscòpica, assaig d'una sola dosi i assaig de dosi-resposta. Es va realitzar un assaig de dosi única amb proteïnes dels cristalls solubilitzades i tripsinizades, per determinar l'activitat citotòxica de totes les soques Bt seleccionades contra les quatre línies cel·lulars d'insectes. Posteriorment, es van realitzar assaigs de dosi-resposta per a les soques més tòxiques contra les línies cel·lulars d'insectes més susceptibles. Per als assaigs d'una sola dosi, es van utilitzar 10 µl de proteïna solubilitzada (a una concentració de 1 µg / µl) o toxina activada amb tripsina (a una concentració de 7 µg / µl). Per a l'assaig de dosi-resposta, les cèl·lules es van tractar amb proteïna tripsinitzada a diferents concentracions, des de 0,64, 3,2, 16, 80 a 400 µg / ml. Els canvis morfològics induïts per toxines es van registrar després de l'observació amb un

microscopi invertit (Leica DMI 3000B), en els intervals temporals d'1, 3, 6 i 16 hores després de l'exposició a la toxina. La viabilitat cel·lular es va mesurar 16 hores després del tractament de les cèl·lules en assaigs de dosi única, i 6 hores després de l'exposició, en assaigs de dosi-resposta. Tots els experiments es van realitzar per duplicat i es van repetir dues vegades.

- Perfil de proteïna i anàlisi proteòmic

Per tal d'obtenir el perfil proteic, les proteïnes solubilitzades i també les tripsinitzades van ser analitzades mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) tal com va descriure Laemmli 1970. Les proteïnes de cristall insecticida produïdes per cadascuna de les soques Bt van ser analitzades per cromatografia líquida i l'espectrometria de masses tàndem LC-MS / MS. Aquestes tècniques es van realitzar al Servei de Proteòmica del SCSIE-Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, a la Universitat de València, València, Espanya..

- Identificació de contingut genètic

L'ADN total de les soques Bt seleccionades va ser extret i purificat segons Ferrandis et al. (1999). Les soques de Bt es van caracteritzar utilitzant 27 parells de primers, be dissenyats en aquest treball o be descrits anteriorment a la bibliografia. Els productes de PCR es van analitzar amb gel d'electroforesi en agarosa, al 1%. L'ADN amplificat es va purificar utilitzant kit NucleoSpin Gel i PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL, Alemanya) i va ser enviat a Stab Vida (Investigação e Servicos em Ciências Biológicas Lda, Portugal) per a la seqüenciació. Les seqüències van ser editades i analitzades utilitzant el programa Geneious (versió 10.0.9). Els anàlisi de les seqüències d'ADN es van realitzar mitjançant la base de dades del NCBI.

- Producció d' β -exotoxina

La possible presència d' β -exotoxina a les soques Bt també va ser determinada per LC-MS / MS. La preparació de la mostra es va fer tal com ho descrivia Hernández et al. 2003.

Segona part: Aïllament, clonació, expressió, i purificació de noves proteïnes insecticides

La soca de Bt IE-1, aïllada de les larves infectades d'*Ephestia kuehniela*, es va caracteritzar en profunditat, analitzant el seu contingut genètic i la seva composició de proteïnes insecticides. La investigació va conduir al descobriment d'un nou gen *cryIIa* en la soca IE-1. Va ser nomenat *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Número MG584186).

- Clonació del gen *cryIIa38*

El gen complet *cryIIa38* es va clonar a partir de l'ADN genòmic extret de la soca IE-1. Els encebadors utilitzats per a l'amplificació del gen per PCR van ser el Ia38-F (5'GGATCCATGAAACTAAAGAATCAAGAT 3') i el Ia38-R (5'GTCGACCTACATGTTACGTTACGCTCAATC 3'). Després de l'amplificació, els productes de PCR es van clonar en el vector de clonació pGEM-T easy. Posteriorment, el gen *cryIIa38* clonat es va subclonar en el vector d'expressió, PET-30a (+). La construcció resultant es va transformar en cèl·lules *E. coli* DH α 5. La seqüència inserida es va confirmar mitjançant seqüenciació amb iniciadors d'inserció, en ambdues direccions. Després de la seqüenciació, els transformants reeixits es van transformar en cèl·lules *E. coli* BL21 (DE3) per a la seva expressió. La proteïna CryIIa38 produïda es va purificar per cromatografia d'afinitat (veure "Expressió, purificació i activació de proteïnes Cry clonades").

- Mutagènesi dirigida pel lloc.

La substitució de Ile¹¹⁶ per Val en la posició 116 es va realitzar mitjançant PCR de solapament-extensió, usant el gen *cryIIa38* clonat en PET-30a (+) com a motlle. La seqüenciació de l'ADN va verificar la mutació puntual.

Tercera part: Investigació de les propietats insecticides i citotòxiques de les toxines CryIIa

La caracterització molecular, activitats insecticides i citotòxiques de la protoxina CryIIa38 i de la proteïna activada, es van estudiar amb larves nounades d'*O. nubilalis*, *G. molesta*, *H. armigera*, *S. exigua* i *S. littoralis*, pel mètode de contaminació en superfície, a una concentració única de 1000 ng / cm². A més, les activitats citotòxiques

de la protoxina Cry1Ia38 i de la toxina activada es van determinar contra la línia cel·lular Sf21, usant quatre concentracions diferents (0,16, 0,8, 4 i 20 mg / ml).

L'activitat insecticida de la Cry1Ia38-I116V (protoxina i toxina activada) es va avaluar contra nounats *d'O nubilalis*, *S. exigua*, *G. molesta* i *S. littoralis* a 1000 ng / cm², com s'ha descrit anteriorment. Les activitats citotòxiques també es van determinar contra la línia cel·lular Sf21, a les quatre concentracions usades per Cry1Ia38.

Per comparar les activitats insecticides amb altres proteïnes Cry1Ia, es va escollir la toxina Cry1Ia7, prèviament analitzada i clonada, i disponible al Laboratori de Control Biotecnològic de Plagues (Departament de Genètica, Universitat de València), on s'ha realitzat aquesta tesi. La seqüència d'aminoàcids de Cry1Ia38 va ser 96% idèntica a la de Cry1Ia7. L'activitat insecticida es va avaluar amb larves de primer estadi *d'O nubilalis*, *G. molesta*, *M. brassicae* i *S. littoralis*, a 1000 ng / cm² similarment a Cry1Ia38. L'activitat citotòxica a quatre concentracions diferents (0.16, 0.8, 4 i 20 mg / ml) també va ser avaluada contra dues línies cel·lulars d'insectes, la Sf21 i la Hi5.

Quarta part: Estudi del pas d'oligomerització en el mode d'acció de les proteïnes Cry1Ia

- Marcatge amb biotina de la proteïna Cry1Ia

La proteïna Cry1Ia activada amb tripsina va ser biotinitada utilitzant el kit de biotinitació de proteïnes de GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, Regne Unit) segons les instruccions del fabricant, tal com es descriu en la bibliografia (Hernández-Martínez et al., 2014).

- Assajos d'oligomerització amb cèl·lules Sf21

Els assajos d'oligomerització es van realitzar segons el metode de Portugal et al (2014) amb lleugeres modificacions. En resum, 100 ml de suspensió cel·lular (2x10⁶ cèl·lules / ml) es va tractar amb toxines activades (Cry1Ia biotinitada i Cry1Ab) a una concentració final de 0,03 mg proteïna / ml. Les plaques es van incubar durant 3 hores a 25 ° C. Posteriorment, les cèl·lules es van recollir per centrifugació a 16.200 × g, 4 ° C durant 15 minuts, es van rentar amb 200 ml de tampó de carbonat 50 mM pH 10.5 i es van recuperar després de centrifugació durant 45 min a 18.800 × g. Les cèl·lules es van re-suspendre en 10 ml de tampó i es van escalfar a 50 °C, 3 minuts. Les proteïnes

presentes a la mostra es van separar per SDS-PAGE al 10% i es van electrotransferir a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana es va bloquejar o / n en PBS amb Tween 20 al 0,1% (PBST) complementat amb llet desnatada al 5%, amb agitació suau. Després de tres rentats amb PBST, la membrana es va incubar amb anticossos: (1) Cry1Ab es va detectar amb anticòs policlonal anti-Bt Cry1Ab / 1Ac de conill (Abraxis Warminster, Pennsylvania, Estats Units) (1: 10.000, 60 min), seguit d'anticòs secundari (1: 20,000; 60 min) acoblat amb peroxidasa de rave picant (HRP), i (2) la proteïna Cry1Ia biotinitada va ser detectada amb HRP conjugada amb estreptavidina (1: 2.000; 60 min). Les dues proteïnes Cry1Ab i Cry1Ia es van visualitzar per quimioluminescència utilitzant el reactiu ECLTM (GE Healthcare) i l'analitzador d'imatges ImageQuant LAS400. Cada assaig d'oligomerització es va repetir almenys tres vegades.

- Assajos d'Oligomerització amb BBMV

Els assajos es van realitzar seguint el protocol d'Ocelotl et al (2015) amb algunes modificacions: 2 mg de Cry1Ia marcada amb biotina o Cry1Ab activada es van incubar, durant una hora amb 5 mg de BBMV de *L. botrana* o *L. decemlineata*, o amb 20 mg de BBMV d'*O. nubilalis*, a 37 ° C, en un volum final de 50 ml. Proteïnes activades incubades en absència de BBMV i mostres que contenen només BBMV, es van usar com a controls. La resta de l'experiment es va dur a terme com s'ha exposat en la secció anterior. Els assajos es van repetir, almenys, tres vegades.

Cinquena part: Avaluació de l'activitat antimicrobiana de les soques de Bt seleccionades

L'efecte inhibitori es va avaluar contra els fongs fitopatògens, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* i bacteri *Erwinia* sp. Inicialment, la presència de gens d'endo i exo-quitinasa es va estudiar mitjançant l'amplificació dels gens respectius per PCR, utilitzant dos parells de primers específics. L'activitat antibacteriana de les set soques de Bt seleccionades contra *Erwinia* sp. es va provar utilitzant el mètode de difusió tal com ho descriu Djenane et al., (2017). L'activitat antifúngica de les soques Bt contra *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* es va estudiar utilitzant el mètode de cultiu dual (Knaak et al., 2007).

Sisena part: Determinació dels canvis bioquímics i fisiològics provocats per les soques Bt, sobre cèl·lules vegetals

- Manteniment de les plantes de tomàquet i inoculació bacteriana

Plantes de tomàquet, *Solanum lycopersicum L.*, (conrear Falat), es van desenvolupar i van mantenir en condicions controlades (25 ± 5 ° C, 16: 8 hores (L / O), $65 \pm 5\%$ RH) en hivernacles, en sòl estèril autoclavat. Plàntules de tomàquet de dues setmanes es van transferir a testos (dues plantes per test) i es van regar diàriament amb aigua. Les plantes de sis setmanes es van dividir en quatre grups: (1). Inoculació de la rizosfera, (2). Controls que van rebre aigua destil·lada estèril en la rizosfera, (3). Inoculació de filoplano i (4). Controls del filoplano, que va ser ruixat amb aigua destil·lada estèril. En dos tractaments, les plantes es van polvoritzar o inocular amb barreges d'espores i cristalls de la soca AzLp. La inoculació de la rizosfera es va fer amb pipetes, afegint 5 ml d'una suspensió de 10^8 espores / ml prop de les arrels. En el tractament de polvorització, el sòl es va cobrir amb plàstic per evitar la transferència de la suspensió de Bt a terra, i es va realitzar amb una suspensió de 10^8 espores / ml, fins a la escorrentia. Es van usar 28 testos de tomàquet en cada tractament, 96 testos en total. Després de 0 (2 hores després de l'aplicació de Bt com 0 dies), 1, 2, 3, 5, 7, 10 i 15 dies després del tractament, es van recollir les fulles madures, es van moldre en nitrogen líquid i es van mantenir a -80 ° C fins al seu ús.

- Respostes bioquímiques i fisiològiques a les plantes de tomàquet

Es van determinar i comparar les activitats enzimàtiques (catalasa, superòxid dismutasa, ascorbato peroxidasa, fenilalanina amoníac-liasa i polifenol oxidasa) i paràmetres no enzimàtics (proteïnes, hidrats de carboni, fenilalanina i fenòlics) en fulles tractades i no tractades.

Per mesurar l'activitat enzimàtica, 0,5 g de la mostra de la fulla es va homogeneïtzar en un ml de tampó fosfat 50 mM pH 6,8 seguit de centrifugació a $13000 \times g$ durant 15 min a 4 ° C. El sobrenedant obtingut es va utilitzar com extracte enzimàtic i es va utilitzar per a la determinació de la catalasa (Aebi 1984), superòxid dismutasa (Beauchamp i Fridovich, 1971), ascorbato peroxidasa (Ranieri et al., 2003) i polifenol oxidasa (Kar i Mishra, 1976). L'activitat de la fenilalanina amoníac-liasa es va mesurar seguint el protocol descrit per Wang et al., (2006).

El contingut de la prolina en les mostres de la fulla es va determinar utilitzant ninhidrina àcida (Carillo i Gibon, 2011). L'estimació del contingut fenòlic total es va realitzar mitjançant el reactiu Folin-Ciocalteu (Ainsworth i Gillespie, 2007). El contingut de proteïnes i el carbohidrat soluble total en fulles de tomàquet es van mesurar tal com es va descriure en Bradford (1976) i en Dreywood, (1946) respectivament.

Resultats i discussió

Primera part: caracterització de soques de *B. thuringiensis*

En aquest estudi es van utilitzar 130 soques de Bt: 88 procedents d'una col·lecció de Bt del Laboratori de Control Biològic de la Universitat de Teheran, i 42 aïllades de mostres de sòl i larves d'insectes infectats recollits de localitzacions ambientalment diverses a l'Iran.

Es van realitzar proves preliminars de selecció amb barreges d'espores i cristalls usant larves de segon estadi de *P. intempunctella*. En base a aquests resultats, les 130 soques de Bt es van classificar en funció de la seva toxicitat en tres grups de virulència: alt, mitjà i baix. Cinc soques de Bt aïllades de larves infectades (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP), així com altres dues soques de Bt aïllades del sòl (DCF i MCH), es van classificar en la primera categoria, causant una mortalitat de més del 67%. La majoria de les soques (119 soques de Bt) no van causar mortalitat significativa (menys del 34%) i només quatre soques van mostrar activitat moderada (34% a 67% de mortalitat). A partir d'aquests resultats, set soques de Bt amb diversa activitat larvicida (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP, altament tòxiques i les soques KHF i RM Bt que van mostrar activitat respectivament baixa i no tòxica) van ser seleccionades i caracteritzades amb més detall en aquest treball.

L'espectre d'activitat tòxica es va avaluar mitjançant bioassajos usant el mètode de contaminació de la dieta en superfície, utilitzant larves de primer estadi dels lepidòpters *S. exigua*, *M. brassicae*, *G. molesta* i *O. nubilalis* (que representen les famílies Noctuidae, Tortricidae, Crambidae i Pyralidae d'ordre Lepidoptera) a una concentració de 1000 ng / cm². *G. molesta* i *O. nubilalis*, van ser els insectes més susceptibles tant a les protoxines com a les toxines activades. Diversos graus de mortalitat es van observar quan es van usar larves de *S. exigua* i *M. brassicae*. Entre

ells, les protoxines i les toxines activades de AzLp, IE-2 i IP-2 van exhibir els nivells més alts de toxicitat per a aquests dos insectes en comparació amb les de l'estàndard Bt HD-1.

Per completar l'anàlisi toxicitat, es van realitzar assajos *in vitro* amb línies cel·lulars de lepidòpters (activitat citotòxica) de la família Noctuidae. Les proteïnes cristal·lines de AzLp, IE-2 i IP-2 van ser les més tòxiques per a totes les línies cel·lulars, especialment per Sf21. Els assajos *in vitro* van indicar que les soques IE-1 i RM van ser poc tòxiques per a totes les línies cel·lulars analitzades, similarment a la soca de referència HD-1. A més, després d'exposar les cèl·lules Sf21 a diferents concentracions de toxines activades de AzLp IE-2 i IP-2, es van observar canvis morfològics, com inflat osmòtic o cèl·lules amb forma de globus. El resultat dels assajos va mostrar que en augmentar la concentració de toxina, la viabilitat de les cèl·lules disminuïa. Les soques IE-2 i IP-2 van exhibir una activitat citotòxica estadísticament similar, amb EC₅₀ de 1,03 i 1,60 mg / ml, respectivament.

Els nostres resultats van mostrar que les soques de Bt seleccionades presentaven perfils proteics similars en SDS-PAGE, compostos per proteïnes amb pesos moleculars entre 130 i 20 kDa. Els perfils de bandes van ser, generalment, similars al de Bt HD-1 i van consistir principalment en dues bandes de aprox. 130 (que podrien correspondre a proteïnes de tipus Cry1) i sobre 65 kDa (probablement corresponent a proteïnes de tipus Cry2 o Cry1 processada). Després de la solubilització, les proteïnes activades amb tripsina van mostrar perfils de bandes en pràcticament idèntics, evidenciant dues bandes majoritàries d'al voltant de 65 kDa.

L'anàlisi proteòmic per LC-MS / MS va mostrar que les proteïnes Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da i Cry2Aa eren les més abundants als cristalls de les soques Bt seleccionades. Les proteïnes de la família Cry1A van ser les més abundants segons els valors quantitius. Cry1Ac va ser l'única proteïna assignada la soca RM. Per a la soca KHF, no es va identificar cap proteïna similar a les proteïnes cristal·lines insecticides de Bt conegudes fins ara.

L'anàlisi de PCR es va dur a terme per identificar els gens codificants per proteïnes Bt, tant les secretades durant l'etapa vegetativa de Bt (gens *cryII*, *vip* i *sip*) com les presents en els cristalls (gens *cry*, *CYT* i *ps*). Es va observar que el gen *cry2* estava present en totes les soques provades. Excloent KHF, les altres soques van produir els amplicons esperats en base als resultats de proteòmica obtinguts anteriorment. Les

soques IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP van mostrar amplificació per PCR positiva per als gens *cryIAc*, *cryII*, *vip3*. En cap de les soques es van amplificar els gens *cryIAd*, *cryIAG*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1*, *vip2*, *sip1*, *ps1*, *ps2*, *ps3* o *PS4*.

Com a pas final de la caracterització, es va investigar la producció de β -exotoxina, requisit necessari per a proposar una nova soca de Bt com a candidat per a ús comercial. La β -exotoxina és tòxica per a vertebrats, de manera que els bioinsecticides basats en Bt que la produeixen estan prohibits. La presència de β -exotoxina es va determinar per LC-MS / MS en el sobrenedant del cultiu de Bt en fase vegetativa. Els resultats van mostrar la seva absència en totes les soques Bt seleccionades, classificant com a aptes per a futurs bioplaguicides.

En resum, d'un total de 130 soques iranianes de Bt, 7 van ser seleccionades per ser extensivament caracteritzades emprant diferents metodologies. Com a resultat, a causa de l'alta toxicitat per a diferents larves i línies cel·lulars d'insectes, la presència de proteïnes insecticides i l'absència de β -exotoxina, les soques AzLp, IE-2 i IP-2 es poden proposar com a candidates per al desenvolupament de nous bioinsecticides basats en Bt.

Segona Part: Aïllament, clonació, expressió i purificació de noves proteïnes insecticides

A causa de l'extensa aplicació de productes basats en Bt, en alguns insectes plaga s'han detectat brots de resistència. S'han emprat diverses estratègies per millorar l'eficàcia dels insecticides basats en Bt i el descobriment de noves soques és necessari per descobrir noves toxines amb diferents modes d'acció i potser un rang més ampli d'activitat insecticida. En aquesta Tesi, en la recerca de nous gens *cry* que codifiquin noves toxines, a la soca IE-1, es va trobar un nou gen tipus *cryIIa*. Va ser anomenat *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Number MG584186), i es va observar que tenia 2160 pb, que codificaven una proteïna de 719 aminoàcids. Aquest gen es va clonar a partir de l'ADN genòmic extret de la soca IE-1 i es va expressar en cèl·lules d'*E coli* BL21. El gen va codificar per una proteïna de 80 kDa, massa molecular única entre les proteïnes cristal·lines de 3 dominis, i comú a totes les toxines CryII. L'activació va donar com a resultat un pèptid estable d'aprox. 50 kDa (toxina activada).

Posteriorment es va comparar la toxicitat de CryIIa38 amb la d'un mutant puntual d'aquesta generat mitjançant mutagènesi dirigida, el CryIIa38-I116V, que té

substituïda lle per Val en la posició 116, en el domini I de la proteïna. L'expressió de Cry1Ia38-I116V va resultar en una protoxina de 80 kDa, que després d'activar es va mostrar com una banda de 50 kDa en SDS-PAGE.

Tercera part: Avaluació de les propietats insecticides i citotòxiques de les toxines Cry1Ia

Els bioassaigs van mostrar que la protoxina Cry1Ia38 era altament tòxica per *O. nubilalis* i *G. molesta*, poc tòxica per a *S. exigua* i *S. littoralis*, i innòcua per *H. armigera*. La proteïna Cry1Ia38 activada, va resultar altament tòxica per *G. molesta* i moderadament tòxica *O. nubilalis*. En base als assaigs de viabilitat cel·lular, Cry1Ia38 (protoxina o toxina) no va ser tòxica per a les cèl·lules Sf21 a les concentracions provades.

L'activitat insecticida de la protoxina i la proteïna tripsinizada de Cry1Ia38-I116V, es va determinar amb de larves d'*O. nubilalis*, *G. molesta* i *S. exigua* i *S. littoralis* a una concentració de 1000 ng / cm². La protoxina va resultar tòxica per *O. nubilalis* i *G. molesta*, mentre que el mutant activat amb tripsina va perdre la toxicitat contra tots dos insectes. Per tant, les dades indiquen que la mutació va afectar l'activitat insecticida. De manera similar al que s'havia trobat amb Cry1Ia38, la protoxina i la toxina activada de Cry1Ia38-I116V no van resultar tòxiques per a les cèl·lules Sf21.

La caracterització molecular i les activitats insecticides i citotòxiques de Cry1Ia7 es van analitzar i van comparar amb les proteïnes obtingudes en el present treball, Cry1Ia38 i Cry1Ia38-I116V. Els nostres resultats van mostrar que la protoxina de Cry1Ia7 era tòxica per *O. nubilalis* i *G. molesta*. Però la toxina activada va donar una toxicitat menor que la d'Cry1Ia38 per *G. molesta*. L'assaig de viabilitat cel·lular va mostrar que Cry1Ia7 no era tòxica per a les cèl·lules Sf21 o Hi5 a les concentracions provades (no es van observar diferències estadísticament significatives entre elles). Només després de 48 hores d'exposició a la concentració més alta de la Cry1Ia7 activada (20 mg / ml), es va observar una pèrdua del 40% de la viabilitat cel·lular en les dues línies cel·lulars.

En resum, en aquesta investigació es va avaluar i va comparar l'espectre insecticida de diferents proteïnes Cry1Ia. D'acord amb els nostres treballs, les protoxines de Cry1Ia38 i Cry1Ia7 van ser tòxiques per a les larves d'*O. nubilalis* i *G.*

molesta. Però la CryIIa7 activada amb tripsina no va mostrar activitat insecticida contra les larves de *G. molesta*, mentre que CryIIa38 sí que ho va fer. En conjunt, tot i que hi ha una alta identitat entre les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes CryIIa provades, es van detectar diferències significatives en l'activitat insecticida de les formes activades per tripsina d'aquestes toxines, en particular, contra *G. molesta*.

Quarta part: Estudi de la oligomerització en la manera d'acció de les proteïnes CryIIa

El mode d'acció de les toxines Cry de Bt comença per la ingestió de les inclusions cristal·lines paraesporals i la seva solubilització (per les condicions de pH de l'intestí mitjà de l'insecte), convertint-les en protoxines. Aquestes són activades per les proteases de l'intestí mitjà de l'hoste, produint nuclis resistents a proteases o toxines. El mode d'acció de les proteïnes Cry de 3-dominis que componen el cristall paraesporal de Bt, no està totalment dilucidat. D'acord amb el model d'unió seqüencial, després d'aquesta activació proteolítica, a l'intestí els monòmers s'uneixen a receptors de membrana tipus cadherina. Aquesta unió desencadena un últim tall proteolític que afavoreix la oligomerització de toxines, i després d'això, la seva inserció en les membranes intestinals i la formació de porus. La formació d'un oligòmer abans de la inserció en membrana s'ha descrit com un pas important i necessari per al procés de toxicitat. A causa de les característiques específiques de les proteïnes CryII (les quals tenen 3 dominis però no formen cristall), una millor comprensió del seu mode d'acció és fonamental per millorar la seva eficàcia enfront de les plagues d'insectes. En aquest estudi, s'ha determinat per primera vegada la formació d'oligòmers de CryIIa i la possible relació entre aquests i la activitat insecticida d'aquesta proteïna.

Atès que les proteïnes CryII tenen activitat doble contra les plagues de lepidòpters i coleòpters, es va estudiar la formació d'oligòmers d'CryIIa7 després d'incubar la proteïna amb BBMV del coleòpter susceptible *L. decemlineata*, del lepidòpter susceptible *L. botrana*, i del lepidòpter no susceptible *O. nubilalis*. A més, en aquest estudi es va emprar la línia cel·lular Sf21 com a model derivat de cèl·lules. També es va seleccionar CryIAb com a proteïna control, per que la seva oligomerització ha estat demostrada en diversos estudis. Els nostres resultats van mostrar clarament que CryIAb pot oligomeritzar en la forma d'tetràmer proposada per altres autors (mida de pes molecular de 250 kDa) després d'entrar en contacte amb

BBMV o cèl·lules d'insectes independentment de la susceptibilitat de l'hoste, ja que es van observar oligòmers després de la incubació de la proteïna tripsinizada amb BBMV d'*O. nubilalis* o *L. botrana* (insectes susceptibles), però també amb BBMV de *L. decemlineata* (no susceptible) i cèl·lules Sf21 (cèl·lules no susceptibles). Però la toxina Cry1Ia va formar oligòmers només després de la incubació amb BBMV de *L. decemlineata* (coleòpter susceptible) però no després de la incubació amb BBMV de lepidòpters o cèl·lules, independentment de la seva susceptibilitat. Basant-se els nostres resultats, el model d'unió seqüencial del mode d'acció de les toxines de Bt de tres dominis, que inclou la oligomerització, pot no ser general per a tots els membres de la família Cry de tres dominis. Aquestes dades indiquen que possiblement Cry1Ia tingui un mode d'acció diferent a altres proteïnes Cry, afavorint que puguin usar-se en combinació amb aquestes últimes en insecticides o plantes transgèniques, per retardar l'evolució de la resistència en els insectes diana.

Cinquena part: Avaluació de l'activitat antimicrobiana de les soques Bt

Fins ara, només les propietats insecticides de Bt atreïen atenció. No obstant això, en els últims anys, s'han descobert altres accions de Bt en el control de malalties de les plantes, ja que hi ha evidències d'una acció antibiòtica d'espores i cristalls de soques de Bt sobre fongs i bacteris fitopatògens. Trobar una formulació basada en Bt específica, fàcilment degradable i de baix cost per controlar tant les plagues d'insectes com les malalties de les plantes, seria altament valuosa en el control biològic.

En aquesta Tesi, es va avaluar l'activitat antimicrobiana de les 7 soques de Bt prèviament seleccionades, contra patògens de plantes com ara el fong *F. oxysporum* o el bacteri *Erwinia* sp. A més, es va estudiar el gen de quitinasa com un important agent antifúngic en les soques de Bt estudiades.

Els nostres resultats van mostrar que les soques IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP posseeixen exoquitinasa. El gen de l'endo-quitinasa es va detectar en les soques AzLp, IE-2 i IP-2. L'activitat antifúngica de les set soques Bt es va avaluar pel mètode de cultiu dual davant de *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* que causa podridura de l'arrel en plantes de tomàquet. El fitopatògen va créixer en la superfície de plaques d'Agar de Dextrosa de Patata i les barreres bacterianes de Bt no van inhibir el seu creixement. Com a resultat, es va concloure que la barreja d'espores i cristalls de les soques de Bt

seleccionades no posseïen activitats antifúngiques. No es va observar correlació entre la presència de gens de quitinasa i l'activitat antifúngica, el que podria explicar-se per una baixa transcripció del gen o per seqüències no transcrites.

L'activitat antibacteriana de les soques de Bt seleccionades es va provar pel mètode de difusió en agar, davant el bacteri patògen Gram negativa, *Erwinia* sp, que causa la malaltia de podridura tova del tomàquet. El bacteri fitopatògen va créixer en tota la superfície de la placa d'Agar Nutritiu i no es van observar zones clares al voltant de les colònies de Bt, el que indica que aquestes soques no van poder controlar *Erwinia* sp. L'activitat antimicrobiana descrita en altres soques de Bt podria ser una conseqüència de l'adaptació d'aquestes soques al seu hàbitat. Per tant, a causa de que la majoria de les soques de Bt estudiades (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP) havien estat aïllades de larves d'insectes infectats o morts, el més probable és que no mostressin cap activitat antimicrobiana contra els agents fitopatògens utilitzats en aquest estudi, usualment presents en el sòl (*F. oxysporum subsp lycopersici* i *Erwinia* sp).

Sisena part: Determinació dels canvis bioquímics i fisiològics provocats per Bt en les cèl·lules vegetals

S'ha descrit que soques de Bt tenen potencial per promoure el creixement de les plantes, millorar l'absorció de nutrients i protegir-les en condicions d'estrès abiòtic i biòtic. Bt pot protegir les plantes a través de la producció de sideròfors, activitat quitinasa, augmentant les activitats dels enzims de resistència de les plantes i induint la resistència sistèmica. Tot i que els pesticides basats en Bt s'han fet servir àmpliament durant anys, se sap molt poc sobre la interacció entre les cèl·lules vegetals i Bt. L'objectiu d'aquesta part de la tesi va ser estudiar la interacció planta-Bt a nivell cel·lular, centrant-nos en l'efecte de la inoculació de Bt sobre l'estat antioxidant de la planta.

Quan les plantes se sotmeten a estrès biòtic o abiòtic, hi ha una producció d'espècies reactives d'oxigen que danyen les seves cèl·lules. Per tant, enzims antioxidants com ara catalasa, superòxid dismutasa, fenilalanina amoníac-liasa i ascorbat peroxidasa són necessàries per eliminar aquestes espècies reactives i restaurar les condicions normals a nivell cel·lular. Quan les plantes pateixen estrès biòtic (com invasió de patògens), es produeixen les reaccions oxidatives (superòxid, peròxid

d'hidrogen i radicals hidroxil) que desencadenen la defensa de la planta en dues fases: la fase un és inespecífica i passa immediatament després del reconeixement del patogen, però la fase dues es perllonga i condueix a la resistència a la malaltia. En aquest treball de Tesi, es va estudiar l'activitat dels enzims antioxidants després de tractar plantes de tomàquet (ruixant el filoplano o inoculant la rizosfera) amb les 7 soques de Bt seleccionades. El resultat va ser un augment significatiu d'aquestes activitats, molt probablement per reduir l'estrès oxidatiu. En el cas de tractar (en filoplano o rizosfera) les plantes de tomàquet amb una barreja d'espores i cristalls de la soca AzLp, es van observar aquestes dues fases.

El tractament de plantes de tomàquet amb suspensió de Bt (barreja d'espores i cristalls) tant en filoplano com a rizosfera, va millorar significativament l'acumulació de proteïnes, carbohidrats, prolina i contingut fenòlic en fulls de tomàquet en comparació amb el tractament no inoculat. Els components no enzimàtics, com la prolina, actuen com una defensa principal contra les espècies reactives d'oxigen. Per tant, en augmentar els continguts fenòlics, de carbohidrats, proteïnes i prolina en els fulls de tomàquet, es disminueix el dany oxidatiu. En conjunt, d'acord amb les nostres observacions, l'impacte de la suspensió de Bt en les cèl·lules de tomàquet va conduir a respostes fisiològiques i bioquímiques que van augmentar l'activitat dels enzims antioxidants i la resistència induïda a l'estrès biòtic.

En resum, la nostra investigació ha caracteritzat extensivament alguns aïllats de Bt iranians seleccionats segons la seva toxicitat a *P. interpunctella*, mitjançant l'ús de diferents tècniques complementàries. La caracterització es va realitzar sobre la base del perfil electroforètic de proteïnes, contingut de gens, anàlisi proteòmic, perfil insecticida i citotòxic i producció de β -exotoxina. Aquesta caracterització integral ha revelat tres soques Bt molt potents per controlar plagues de lepidòpters. Seguint els objectius d'aquesta tesi, l'efecte de les proteïnes de les soques de Bt seleccionades es va avaluar usant cèl·lules animals (línies cel·lulars d'insectes), cèl·lules microbianes (cultius d'*Erwinia* sp. i *Fusarium*) i cèl·lules vegetals (plantes de tomàquet). Per trobar noves activitats insecticides, es van explorar les soques seleccionades a la recerca de nous gens *cry*. Com a resultat, es va descobrir el gen *cryIIa38*, i tant aquest com un mutant puntual d'aquest, es van clonar i expressar. Les activitats insecticides i citotòxiques de les proteïnes CryII es van avaluar enfront de diferents espècies de lepidòpters i línies cel·lulars d'insectes. Els resultats dels nostres bioassaigs van mostrar que CryIIa38 en

forma de protoxina o de toxina activada, té un gran potencial per controlar *O. nubilalis* i *G. molesta*. Finalment, es van realitzar estudis de biologia molecular per estudiar la oligomerització de la proteïna Cry1Ia. Els nostres treballs van mostrar que la oligomerització no és un pas necessari en la toxicitat d'aquestes proteïnes.

Conclusions

- Es va assajar l'activitat insecticida de 130 soques de Bt iranianes aïllades de diferents hàbitats, contra larves de segon estadi de *P. interpunctella*. Només 7 soques (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEP, DCF i MCH) van ser actives contra aquesta plaga.
- Per estudiar i predir la potència insecticida de les noves soques de Bt, es van dur a terme diferents tipus de caracterització complementaris: assajos de toxicitat *in vivo* i *in vitro*, perfils proteics per SDS_PAGE, anàlisi proteòmic, identificació de contingut gènic i producció de β -exotoxina.
- A causa de l'alta toxicitat front diferents lepidòpters i línies cel·lulars, la presència de les proteïnes insecticides, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca i Cry1Da, i l'absència de β -exotoxina, les soques AzLp, IE-2 i IP-2 van ser proposades com a candidates adequades per al desenvolupament de futurs insecticides basats en Bt.
- Les soques Bt estudiades (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEP, RM i KHF), no van poder controlar el bacteri patògen de plantes *Erwinia* sp.
- Les soques IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 i IEP posseeixen exoquitinasa i el gen d'endoquitinasa es va observar en les soques AzLp, IE-2 i IP-2 Bt. No obstant això, la barreja d'espores i cristalls de les soques de Bt no van mostrar activitat antifúngica contra *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. No es va observar correlació entre la presència de gens de quitinasa i l'activitat antifúngica.
- La inoculació o ruixat de les plantes de tomàquet amb AzLp va reduir l'estrès oxidatiu a través d'un augment significatiu de les activitats enzimàtiques antioxidants (catalasa, superòxid dismutasa, fenilalanina amoníac-liasa i ascorbat peroxidasa).
- La inoculació o ruixat de les plantes de tomàquet amb suspensions d'espores i cristalls de Bt va millorar significativament l'acumulació de proteïnes, carbohidrats, prolina i contingut fenòlic en els fulls de tomàquet.

- L'impacte de Bt en les cèl·lules de tomàquet va conduir a respostes fisiològiques i bioquímiques, i finalment va augmentar l'activitat d'enzims antioxidants i la resistència sistèmica induïda en les plantes enfront de possibles invasions de fitopatògens.
- El gen *cryIIa38* es va aïllar de la soca IE-1 i es va clonar i expressar amb èxit en cèl·lules d'*E. coli*.
- CryIIa38 té un gran potencial per controlar *O. nubilalis* i *G. molesta*.
- La protoxina de CryIIa38-I116V, generada per mutagènesi dirigida, va resultar tòxica per *G. molesta*, mentre que la proteïna activada perdre la seva toxicitat cap a aquesta plaga.
- La protoxina de CryIIa7 va resultar tòxica per *O. nubilalis* i *G. molesta*. Després de 48 hores d'exposició a la concentració més alta de CryIIa7 activada (20 mg / ml), es va observar una pèrdua del 40% de la viabilitat cel·lular en les línies cel·lulars Sf21 i Hi5.
- Es van detectar per primera vegada oligòmers de CryIIa, però només després de la seva incubació amb BBMV de *L. decemlineata* (coleòpter susceptible). No s'ha trobat estructura oligomèrica després d'incubació amb BBMV de lepidòpters o amb cèl·lules Sf21, independentment de la seva susceptibilitat. Per tant, sembla que la oligomerització, pot no formar part del mode d'acció de les proteïnes CryIIa.

Referències

1. **Aebi, H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods. Enzymol.* 105: 121-126.
2. **Ainsworth EA. And Gillespie.** 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4):875-878.
3. **Beauchamp C. and Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
4. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
5. **Carillo, P., Gibbon, Y.,** 2011. Protocol: Extraction and Determination of Proline. PrometheusWiki01/2011. <http://www.researchgate.net/publication/211353600> PROTOCOL Extraction and determination of proline.

6. **Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H and Ferré J.** 2017. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins* 9:139-158.
7. **Dreywood R.** 1946. Qualitative test for earbohydrate material. *Industrial attd Engineeritig Chemistry - Atialytical Edition* 18, 499.
8. **Escriche B, Silva FS, Ferré J.** 1995. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal protein. *J. Invertebr. Pathol.* 65:318–320.
9. **Estela A, Escriche B, Ferré J.** 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Environ Microbiol* 70:1378–1384.
10. **Ferrandis MD, Juárez-Pérez VM, Frutos R, Bel Y, Ferré J.** 1999. Distribution of cryI, cryII and cryV Genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Syst Appl Microbiol* 22:179–185.
11. **Hernández CS, Martínez C, Porcar M, Caballero P, Ferré J.** 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *J Invertebr Pathol* 82:57-62.
12. **Hernández-Martínez P., Vera-Velasco NM., Martínez-Solís M., Ghislain M., Ferré J. and Escriche B.** 2014. Shared binding sites for the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa in the African sweet potato pest *Cylas puncticollis* (Brentidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 80(24): 7545-7550.
13. **Hernández-Martínez, P., Ferré, J., and Escriche, B.** 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 245–250.
14. **Kar, M. and Mishra, D.** 1975. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
15. **Khorramnejad A., Bel Y., Hernández-Martínez P., Talaei-Hassanloui R. and Escriche B.** 2018. Insecticidal activity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* CryIIa protein. *GMOs in Integrated Plant Protection IOBC-WPRS Bulletin.* 131: 56-63.
16. **Knaak, N. Rohr, A.A. and Fiuza, L.M.** In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* 2007, 38, 526–530.
17. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
18. **Martínez, C., M. Porcar, A. López, I. Ruiz de Escudero, F. J. Pérez-Llarena, & P. Caballero.** 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol. Exp. Appl.* 111:71-77.
19. **Ocelotl J., Sánchez J., Arroyo R., Gracia-Gómez BI., Gómez I., Unnithan GC., Tabashnik BE., Bravo A. and Soberón M.** 2015. Binding and oligomerization of modified and native Bt toxins in resistance and susceptible pink bollworm. *PlosOne* 10 (12).
20. **Portugal L., Gringorten JL., Caputo GF., Soberón M., Muñoz-Garay C. and Bravo A.** 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides* 53:292-299.

21. **Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. and Soldatini, GF.** 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54: 2529-2540.
22. **Sayyed, A.H., Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M., Escriche, B., Wright, D.J., Crickmore, N.,** 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutellaxylostella* to *Bacillusthuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 11, 6863–6868.
23. **Wang, WJ., Zheng, LP., Wu, JY. And Tan, RX.** 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxusyunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
24. **Wolfersberger MG, Luthy P, Parenti P, Parenti P, Sacchi VF, Giordana B, Hanozet GM.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pierisbrassicae*). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 86A:301–308.



University of Tehran
College of Agriculture & Natural Resources
Plant Protection Department



University of Valencia
Faculty of Biological Science
Genetic Department

Structural and functional diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins on animal, plant and microbial cells

By
Ayda Khorramnejad

Supervisors

Dr. Reza Talaei-Hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Advisor

Dr. Yolanda Bel Cortes

A thesis submitted to the graduate studies office in partial fulfilment of the requirements for the degree of the international joint supervision of Doctor of Philosophy in
**Agricultural Entomology (Ecology and Biological Control) from University of Tehran
and
Biotechnology and Biomedicine from University of Valencia**

November 2018

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is one of the most successful entomopathogens in biological control of pests. The identification of new Bt strains is a topical issue in order to discover novel Bt toxins to broaden the range of insecticidal activities and to manage insect resistance. Due to the importance of Bt, Iranian Bt strains were screened according to their toxicity against *Plodia interpunctella*. Strains with diverse larvicidal activity were characterized according to their gene content, protein composition, the spectrum of insecticidal and cytotoxic activity against lepidopteran pests, the production of β -exotoxin, and the anti-microbial activity and biochemical effects on plant cells. As a result, due to high toxicity exhibited towards lepidopteran insect larvae and cell lines, and to the absence of β -exotoxin, the AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains were introduced as suitable candidates for development of new Bt based bio-insecticides. The inoculation of tomato plants with spore and crystal mixture of the selected Bt strains, increased the activity of antioxidant enzymes and induced resistance to probable pathogen invasions and to biotic and abiotic stress in the tomato plants, but no antimicrobial activities were recorded against phytopathogens such as the fungus *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* and or the bacteria *Erwinia* sp.

The gene content analyses of the highly insecticidal Bt strains conducted to the isolation of the *cryIIa38* gene from the IE-1 Bt strain. Subsequently, the gene was successfully cloned. Based on our results, CryIIa38 protein has a great potential for controlling *Ostrinia nubilalis* and *Grapholita molesta*. Due to the specific features of the CryII proteins, the formation of an oligomeric structure formed by CryIIa toxin monomers and the association between oligomerization and insecticidal activity of this protein, have been investigated. Based on our results, toxin oligomerization may not be widely generalized for the CryIIa toxins.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Insect cell lines, LC-MS/MS, CryIIa proteins, Oligomer formation, Anti-microbial activity, Plant biochemical response.

Summary

Background and aim of the study:

Due to deleterious effects of chemical insecticides on ecosystem and non-target organisms, implementation of biological control agents has received considerable attention. Amongst biological control agents, remarkable interest has been devoted to entomopathogens, because of their potential for controlling agricultural and household pests, vectors of human and animal diseases without introducing non-degradable material into environment. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is the most commercially used microbial control agent with effectiveness against different insect pest species. Different Bt strains produce proteinaceous parasporal crystals during the sporulation phase of bacterial growth, called δ -endotoxin or Cry (from crystal) proteins. Moreover, this bacterium, during the vegetative growth phase, produces other type of insecticidal proteins, namely CryII, Vip and Sip. The CryII proteins do not form part of the Bt crystal but are also named “Cry” because they share, with the majority of crystal proteins, a 3-domains structure. The Bt Cry insecticidal proteins are highly selective, non-toxic to vertebrates and rapidly degradable. Hence, due to these characteristics, Bt has gained a great importance in agricultural insect pests control and many studies have focused on the isolation and characterization of novel Bt strains that may lead to finding new toxins with broader spectrum of activity and greater insecticidal toxicity.

Specific objectives:

Due to importance of Bt in microbial control of pests, this thesis was aimed to investigate the following objectives:

- Characterization of Iranian Bt isolates
- Expression, isolation and purification of new insecticidal proteins such as CryIIa
- Assessment of insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa toxins
- Study of the oligomerization step in mode of action CryIIa proteins
- Evaluation of the antimicrobial activity of Bt strains
- Determination of the biochemical effects of Bt strains on plant cells

According to these objectives, the thesis has been divided into six main parts that correspond to each one of them.

Materials and methods

The general Materials and Methods used in this work, are described below. Other specific methodologies used in each one of the six main parts that compose this thesis, are described after, under the title of each one of the announced parts.

- Bacterial strains

A total number of 130 Iranian Bt strains from Bt stock of Biological Control Laboratory in the University of Tehran, were used in this study. Moreover, the *B. thuringiensis* HD1 strain HD1S2005 (Bt HD1) (kindly provided by Valent Bioscience, Inc., Libertyville, IL, USA) and the *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain HD2 (Berliner) (Bt HD2) (obtained from the Bacillus Genetic Stock Center, BGSC, Ohio State University, Ohio, USA), were used as reference standard strains. *Escherichia coli* DH α 5 and BL21 (DE3) strains were employed as competent cells for gene cloning and protein expression.

- Insect rearing

Eight different lepidopteran species and one coleopteran pest were used in this research for performing the bioassays experiments and oligomer formation assays. Amongst the lepidopteran insect species, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* belong to Noctuidae family, *Grapholita molesta*, *Plodia interpunctella* and *Ostrinia nubilalis* of the families of Tortricidae, Pyralidae and Crambidae, respectively, were used to perform the bioassay experiments. While *Lobesia botrana* (Tortricidae), *O. nubilalis* and one coleopteran host; *Leptinotarsa decemlineata* of the family Chrysomelidae, were selected for preparation of brush border membrane vesicles and performing oligomer formation assays. All the insect colonies reared on the artificial diet and kept at 25 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ RH and with a 16:8 L:D photoperiod.

- Insect cell lines

Four insect cell lines were used in this study: BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) from ovarian cells of cabbage looper, *Trichoplusia ni*, RP-HzGUTAW1 (HzGUT) from gut cells of *Helicoverpa zea*, UCR-SE from beet armyworm, *S. exigua* and Sf21 cells from ovaries of the fall armyworm, *S. frugiperda*. Insect cell lines were grown in appropriate cell

culture medium and maintained under the conditions recommended by the supplier (Laboratory of Virology, Wageningen University, The Netherlands).

- **Brush border membrane vesicles (BBMV) preparation**

Brush border membrane vesicles (BBMV) were purified from dissected midguts of last instar larvae of *O. nubilalis* and *L. decemlineata* and whole insect (last instar larvae) of *L. botrana*, by the differential magnesium precipitation method (Wolfersberger et al., 1987), as modified by Escriche et al., (1995). Purified BBMV were quantified by Bradford protein assay and stored at -80°C until use.

- **Protoxin solubilisation and toxin activation**

B. thuringiensis strains were grown on CCY agar medium and incubated at 29°C for 2 days. Production and further solubilization of the Bt crystal proteins was performed as described by Estela *et al.*, (2004). Protein concentration was determined by Bradford assay (Bradford, 1976). Protoxin activation was carried out by adding 10% trypsin (w/w) and incubating the sample for 2 hours at 37°C. Solubilized and trypsin activated proteins were analyzed by sodium dodecyl sulphate 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli 1970.

- **Cry proteins expression, purification and trypsin activation**

The Cry1Ab protein (used as a control in this study), was obtained from a recombinant *E. coli* strain GG094-208 (from Dr. R.A. de Maagd, Wageningen University, The Netherlands). The Cry1Ia7 protein originally obtained from a Spanish strain of Bt, HU4-2 (Martínez *et al.*, 2004), was kindly provided by Dr. Primitivo Caballero (Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain). The Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7 proteins were expressed in the recombinant *E. coli*, BL21 (DE3) cells.

The Cry1Ab protein expression, inclusion bodies purification, solubilization and protoxin activation by trypsin was performed as described previously (Sayed *et al.*, 2005). To obtain the main fragment corresponding to Cry1Ab activated toxin, anion-exchange chromatography in a MonoQ 5/5 column using Äkta 100 explorer system (GE Healthcare, United Kingdom) was performed. The eluted fractions from the column were

individually analysed by sodium dodecyl sulphate 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The expression of Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7 proteins in the recombinant *E. coli*, BL21 (DE3) cells, affinity purification using a HisTrap™ FF crude column (GE Healthcare Bio-Sciences, Upsala, Sweden), protein dialysis and protoxin activation by trypsin were performed as reported by Khorramnejad *et al.*, (2018).

The concentration of Cry1Ab, Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7 proteins were estimated by densitometry using TotalLab Quant program version 12.3, employing bovine serum albumin, as a standard protein.

Specific Methodology:

First part: *B. thuringiensis* strains characterization

Iranian Bt strains isolation

The acetate selective method was used to isolate, initially, the Bt strains. In this method, sodium acetate (0.25 mM) selectively inhibits the germination of Bt spores not that of other spore-formers, thus the germinated spores and other non-spore forming bacteria were eliminated by following heat treatment, 7 min at 80 °C. Then samples were plated on nutrient agar and allowed to grow overnight at 29°C. Colonies resembling Bt were examined for gram staining and the presence of parasporal crystals were observed by phase contrast microscopy. The Bt isolates were detected based on the capacity of producing parasporal crystal inclusions.

- Bioassay experiments

Preliminary selection of insecticidal Bt strains was performed recording the toxicity of the 130 native Bt strains against second instar larvae of *P. interpunctella*. The screening bioassays were performed with a single discriminating concentration of 10⁸ cells/ml (higher than the calculated LC₅₀) against *P. interpunctella* larvae by food incorporation method. Assays were carried out using 20 second instar larvae of Indian meal moth per concentration, with three replicates. Water was used as a negative control. Mortality was recorded after 72 hours treatment.

Based on this screening, seven Bt strains with different larvicidal activity were selected and bioassayed against neonates of *S. exigua*, *G. molesta*, *O. nubilalis* and *M. brassicae* by surface contamination method as described by Hernández-Martínez et al., 2008. Bioassay experiments were performed with protoxins and activated toxins, and were repeated three times with 48 larvae in each replicate. The solubilization buffer and HD1 were used as negative control and reference strain, respectively. Bioassays were conducted at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH and 16:8 L/D photoperiod. Mortality was scored after 7 days.

- **Cell viability assays**

Cell viability was assayed using CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega Co., Madison, WI, USA) based on tetrazolium salt (MTT- 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction method. The cell viability assay, as a less cost, time and material consuming technique, was performed using four lepidopteran cell lines from *T. ni* (Hi5), *H. zea* (HzGUT), *S. exigua* (UCR-SE) and *S. frugiperda* (Sf21). The cytotoxic activity was investigated by microscopic observation, single-dose assay and dose-response assay. A single-dose assay was carried out with solubilized and trypsin activated proteins to determine the cytotoxic activity of all selected Bt strains against the four different insect cell lines. Subsequently, dose-response assays were performed for the most toxic strains against the most susceptible insect cell lines. For the single-dose assays, 10 μl of either solubilized protein (at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) or trypsin activated toxin (at a concentration of 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), were used. For dose-response assay, cells were treated with trypsinized protein at different concentrations, from 0.64, 3.2, 16, 80 to 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Morphological changes induced by toxins were recorded after observation with an inverted microscope (Leica DMI 3000B), at the time intervals of 1, 3, 6 and 16 hours after exposure to toxin. Cell viability was measured 16 hours after treating the cells in the single-dose assays, and 6 hours after exposure in dose-response assays. All experiments were performed in duplicate and repeated twice.

- **Protein profile and proteomic analysis**

Solubilized and trypsin activated proteins were analyzed by sodium dodecyl sulphate 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli 1970. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was

performed at the proteomics facility of the SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental), at the University of Valencia, Valencia, Spain. The insecticidal crystal proteins produced by each one of the Bt strains were analyzed by LC-MS/MS.

- **Gene content identification**

The total DNA from the selected Bt strains was extracted and purified following Ferrandis et al. (1999). Bt strains were characterized by using 27 pairs of primers designed in this work or previously described in the bibliography. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The amplified DNA was purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) and sent to Stab Vida (Investigação e Serviços em Ciências Biológicas Lda, Portugal) for sequencing. The sequences were edited and analyzed using Geneious software (version 10.0.9). The DNA sequence analyses including alignment and blast were performed using the NCBI database.

- **B-exotoxin production**

The possible presence of β -exotoxin in the Bt strains was also determined by LC-MS/MS. Sample preparation was done as described by Hernández et al. 2003.

Second part: Expression, isolation and purification of new insecticidal protein

IE-1 Bt strain isolated from infected *Ephestia kuehniela* larvae was characterized deeply according to its gene content and crystal protein composition. In the investigation of gene contents of Bt strains, new *cryIIa*-type gene was found in the Bt IE-1 strain. It was named *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Number MG584186).

- **Cloning of *cryIIa38* gene**

The full-length *cryIIa38* gene was cloned from extracted genomic DNA of IE-1 Bt strain. The primers used for amplification of *cryIIa38* gene by PCR were Ia38-F (5'GGATCCATGAACTAAAGAATCAAGAT 3') and Ia38-R (5'GTCGACCTACATGTTACGTTACGCTCAATC 3'). After amplification, full-length PCR

products were cloned into a cloning vector, pGEM-Teasy. Later, the cloned *cryIIa38* gene was sub-cloned into the expression vector, pET-30a(+). The resulting construct was transformed into *E. coli* DH α 5 cells. The correct sequence of generated amplicon was confirmed by sequencing with insert primers, in both directions. After sequencing, successful transformants were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells for protein expression. The expressed CryIIa38 protein was purified with Ni²⁺ affinity chromatography due to the histidine tag, as explained in “Expression, purification and trypsin activation of Cry proteins” part.

- **Site-directed mutagenesis**

The substitution of the Ile¹¹⁶ by Val at the position 116 in domain I was obtained by overlap-extension PCR, using *cryIIa38* gene cloned into pET-30a(+) as a template. DNA sequencing at the STABVIDA verified the single point mutation. Therefore, CryIIa38-I116V mutant was generated by site-directed mutagenesis.

Third part: Assessment of insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa toxins

The molecular characterization, insecticidal and cytotoxic activities of CryIIa38 protoxin and trypsin activated protein were studied in this research against *O. nubilalis*, *G. molesta*, *H. armigera*, *S. exigua* and *S. littoralis* neonates, at the concentration of 1000 ng/cm². The cytotoxic activity of CryIIa38 protoxin and trypsin activated toxin was also determined against Sf21 cell line, at four different concentrations (0.16, 0.8, 4 and 20 μ g/ml).

The insecticidal activity of protoxin and trypsin activated toxin of CryIIa38-I116V protein was assessed against *O. nubilalis*, *S. exigua*, *G. molesta* and *S. littoralis* neonates at the concentration of 1000 ng/cm², by surface contamination method. The cytotoxic activity of CryIIa38-I116V protoxin and trypsin activated toxin was also determined against Sf21 cell line, at four different concentrations (0.16, 0.8, 4 and 20 μ g/ml).

To compare the insecticidal activity of CryIIa38 with other CryIIa proteins, CryIIa7 toxin has been selected. The CryIIa7 protein, had deeply been analyzed previously and was available as a cloned gene in Biotechnological Control of Pest

Laboratory, Genetic Department at the University of Valencia (laboratory where this PhD work has been partially accomplished). The amino acid sequence of Cry1Ia38 is 96% identical to Cry1Ia7 protein. The insecticidal activity of Cry1Ia7 protein originally obtained from a Spanish Bt strain HU4-2, was assessed against *O. nubilalis*, *G. molesta*, *M. brassicae* and *S. littoralis* first instar larvae at a concentration of 1000 ng/cm². The cytotoxic activity of Cry1Ia7 toxins at four different concentrations (0.16, 0.8, 4 and 20 µg/ml) was also evaluated against two lepidopteran cell lines, Sf21 and Hi5.

Forth part: Studying the oligomerization step in mode of action Cry1Ia proteins

- Cry1Ia biotin labelling

Trypsin activated Cry1Ia protein was biotinylated by using the protein biotinylation kit from GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions, as described elsewhere (Hernández-Martínez et al., 2014).

- Oligomerization assays with Sf21 cells

The oligomerization assays were performed as described by Portugal et al (2014) with slight modifications. In short, 100 µl of cell suspension by the concentration of 2×10^6 cells/ml were treated with final concentration of 0.03 µg protein/µl of activated toxins (biotinylated Cry1Ia and unlabelled Cry1Ab). The plates were incubated for 3 hours at 25°C. After the incubation, the treated cells were collected and pelleted by centrifugation at $16,200 \times g$, 4°C for 15 min. After washing the pellet with 200 µl of 50 mM carbonate buffer pH 10.5, the Sf21 cells (in the pellet) were recovered by centrifugation 45 min at $18,800 \times g$. The final pellet was resuspended 10 µl of buffer and heated at 50 °C for 3 min. The proteins present in the sample were separated by SDS-PAGE 10% and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The membrane was incubated overnight in blocking buffer (PBST; 0.1% Tween 20 in phosphate-buffered saline supplemented with 5% skimmed milk) with gentle shaking, and washed three times with PBST before incubation with antibodies. Cry1Ab protein was detected with polyclonal rabbit anti-Bt Cry1Ab/1Ac (1:10,000; 60 min) from Abraxis (Warminster,

Pennsylvania, United States) followed by secondary antibody (1:20,000; 60 min) coupled with horseradish peroxidase (HRP), whereas biotinylated Cry1Ia protein was detected by streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2,000; 60 min). Both Cry1Ab and Cry1Ia proteins were visualized by chemiluminescence using ECLTM prime western blotting detection reagent (GE Healthcare) using an ImageQuant LAS400 image analyzer. The molecular weight marker used was Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad, Carlsbad, CA). Each oligomerization assay was repeated at least three times.

- **Oligomerization assays with BBMV**

The oligomerization assays with BBMV were performed following Ocelotl et al (2015) with some modifications: 2 µg of biotin labelled Cry1Ia and activated Cry1Ab toxins were incubated for one hour with 5 µg of *L. botrana* or *L. decemlineata* BBMV, or with 20 µg of *O. nubilalis* BBMV, at 37°C, in a final volume of 50 µl. Activated proteins incubated in the absence of BBMV and samples containing only BBMV were used as controls. The rest of experiment was carried out as explained in the previous section. These experiments were repeated, at least, three times.

Fifth part: Evaluating the antimicrobial activity of Bt strains

The inhibitory effect of seven previously fully characterized Bt strains was assessed against phytopathogenic fungi, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*, and bacterium *Erwinia* spp. Initially, the presence of endo- and exo-chitinase genes was studied by PCR amplification using two pairs of specific primers. The antibacterial activity of seven Bt strains against *Erwinia* spp. was tested using plug diffusion method as described by Djenane et al., (2017). The antifungal activity of Bt strains against *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* was studied using dual culture method (Knaak et al., 2007).

Sixth part: Determining the biochemical effects of Bt strains on plant cells

- **Plant growth and bacterial inoculation**

Tomato plants, *Solanum lycopersicum* L. (Falat cultivar) were grown in an autoclaved and sterile soil in greenhouse under controlled conditions (25 ± 5°C, 16L:8D

hours photoperiod, $65 \pm 5\%$ RH). After two weeks, tomato seedlings were transferred to plastic pots with two plants per pot and watered daily with tap water. Later, six-week old plants were split into four groups; 1. Rhizosphere inoculation, 2. Control plant which received sterile distilled water in the rhizosphere, 3. Phylloplane inoculation and 4. Control plants which the phylloplane was sprayed with sterile distilled water. In two treatments, plants were inoculated by the mixture of spores and crystals of AzLp Bt strain at the concentration of 10^8 spore/ml, through spraying the phylloplane and/or inoculating the rhizosphere. In rhizosphere inoculation treatment, 5-ml of a 10^8 spore/ml suspension of AzLp Bt strain was applied with a pipette near the roots of each plant in the pot. In the phylloplane inoculation treatment, the soil was covered with plastic to prevent the transference of Bt suspension to the soil. The phylloplane of tomato plants were sprayed with 10^8 spore/ml suspension of AzLp Bt strain till run-off. In this experiment, 28 tomato pots were used in each treatments, all together 96 tomato pots were employed. After 0 (2 hours after Bt application was considered as 0 day), 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 15 days post treatment, mature leaves were collected and completely ground in liquid nitrogen. The leaf powder samples were kept at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ till use.

- **Tomato plants biochemical and physiological responses**

The enzymatic activities (catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase) and non-enzymatic parameters (protein, carbohydrate, phenylalanine and phenolic contents) were determined and compared in treated and non-treated leaves.

For measuring the enzymatic activity, 0.5 g of the leaf sample was homogenized in one ml of 50 mM phosphate buffer pH 6.8 followed by centrifugation at $13000 \times g$, for 15 min at $4\text{ }^\circ\text{C}$. The obtained supernatant was used as enzyme extract and used for determination of catalase (Aebi 1984), superoxide dismutase (Beauchamp and Fridovich, 1971), ascorbate peroxidase (Ranieri et al., 2003) and polyphenol oxidase (Kar and Mishra, 1976). The activity of phenylalanine ammonia-lyase was measured following Wang et al., (2006) protocol.

The proline content in the leaf samples was determined by using acid ninhydrin (Carillo and Gibon, 2011). Estimation of the total phenolic content was performed by using Folin-Ciocalteu reagent (Ainsworth and Gillespie, 2007). The protein content

(Bradford, 1976) and the total soluble carbohydrate (Dreywood, 1946) in tomato leaves were measured as described elsewhere.

Results and Discussion

First part: *B. thuringiensis* strains characterization

A total number of 130 Iranian Bt strains were used in this study: 88 Bt strains came from a Bt stock of Biological Control Laboratory in the University of Tehran, and 42 Bt strains were isolated from soil and infected insect larvae collected from environmentally diverse sources in Iran.

Preliminary screening tests were performed with mixtures of spores and crystals on *P. interpunctella* second instar larvae. Based on the results, the 130 Bt strains were classified regarding to their toxicity in three different virulence groups; high, medium and low. All the five Bt strains isolated from infected larvae (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp), as well as, two other Bt strains isolated from soil (DCf and MCh), were categorized in the most toxic group, causing a mortality of more than 67%. In spite of using high concentration, most strains (119 Bt strains) did not cause significant mortality (less than 34%) and only four strains showed moderate activity (34% to 67% mortality). From these results, seven Bt strains with diverse larvicidal activity against *P. interpunctella* were selected and characterized in more detail in the present work. The selected strains were: IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp, highly toxic for Indian meal moth larvae, and KhF and RM Bt strains which showed respectively, low and non-toxic activity against *P. interpunctella*.

The spectrum of lepidopteran toxic activity was assessed against *S. exigua*, *M. brassicae*, *G. molesta* and *O. nubilalis* that represent four different families, Noctuidae, Tortricidae, Crambidae and Pyralidae of order Lepidoptera. The susceptibility of the lepidopteran pests to the solubilized and trypsin activated crystal proteins at a single concentration of 1000 ng/cm², was evaluated by surface contamination method using first instar larvae. Two species, namely *G. molesta* and *O. nubilalis*, were the most susceptible insects to both, the protoxins and the trypsin activated toxins. Various degrees of mortality were found in *S. exigua* and *M. brassicae* neonates treated with the selected strains. Among those, AzLp, IE-2 and IP-2 protoxins and activated toxins, exhibited the highest levels of toxicity for *S. exigua* and *M. brassicae*, compared to those of the standard reference Bt (HD-1-S-2005).

To complete the analysis of the insecticidal activity, *in vitro* toxicity assays with lepidopteran cell lines (cytotoxic activity) were performed. According to the effect of Bt toxins on cultured insect cells from family Noctuidae, (order Lepidoptera), crystal proteins from AzLp, IE-2 and IP-2 were the most toxic for all tested cells especially for Sf21. *In vitro* assays indicated that IE-1 and RM strains were the least toxic for all the tested cell lines, as the reference strain HD-1. Moreover, morphological changes including osmotic swelling and balloon-shaped cells, were observed in Sf21 cells after exposing to different concentrations of AzLp, IE-2 and IP-2 trypsin activated toxins. The result of dose-response assays showed that by increasing the concentration of trypsin activated toxin, viability of Sf21 cells decreased. IE-2 and IP-2 Bt strains exhibited a similar cytotoxic activity, statistically similar EC_{50} values (1.03 and 1.60 $\mu\text{g/ml}$, respectively).

According to our findings, the selected Bt strains showed similarity in their SDS-PAGE and protein profile, composed of proteins with molecular weights between 130 and 20 kDa. The protein compositions resembled that of Bt subsp. *kurstaki* (HD-1) and consisted of two major bands of 130 and 60 kDa. The most common pattern was composed of proteins around 130 kDa in size, corresponding to Cry1-type proteins. Parasporal inclusions from strains IE-1, IP-2 and IEp showed a distinct additional band by the weight of 65 to 75 kDa corresponding, most probably, to *cry2*-type proteins. After solubilization, proteins were treated with 10% trypsin (w/w) for activation. SDS-PAGE profiles of the activated toxins were almost identical for all strains and showed two major bands of about 65 kDa.

The LC-MS/MS analysis (which served as a confirmation of the transcription of the previously detected genes) showed that Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da and Cry2Aa proteins were the most abundant proteins in the solubilized crystals of the selected Bt strains. The proteins from the Cry1A family were the most abundant ones according to quantitative values. Cry1Ac was the only protein assigned to RM strain. For KhF strain, no protein similar to the known Bt insecticidal crystal proteins were identified.

PCR analysis was carried out to identify the genes encoding the Bt proteins, including both the ones secreted during vegetative step of Bt (*cryII*, *vip* and *sip* genes) and the ones present in the crystals (*cry*, *cyt* and *ps* genes). Positive amplification of *cry2*

gene was observed in all tested strains. Excluding KhF, the other strains yielded the expected amplicons (based on the results obtained in the SDS-PAGE analysis) for *cryI* genes. Strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp showed positive PCR amplification of the predicted bands for *cryIAc*, *cryII*, *vip3* genes. None of the strains showed amplification for *cryIAd*, *cryIAG*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1*, *vip2*, *sip1*, *ps1*, *ps2*, *ps3* and *ps4* genes.

As a final step in the characterization of the selected strains, the production of β -exotoxin was investigated as a necessary requirement to propose a new Bt strain as a candidate for commercial use. The β -exotoxin (an ATP analog) shows toxicity to vertebrates. Then, bioinsecticides based on Bt producing β -exotoxin are prohibited by law in many countries. The presence of β -exotoxin was determined in the supernatant of liquid culture of Bt strains by LC-MS/MS and results showed absence of type I β -exotoxin in all the selected Bt strains, making them suitable as candidates for future biopesticides.

In brief, of a total of 130 Bt Iranian strains, 7 were selected to be thoroughly characterized by employing different methods. As a result, due to high toxicity towards different lepidopteran insect larvae and insect cell lines, the presence of the insecticidal proteins, and the absence of β -exotoxin, three Bt strains; AzLp, IE-2 and IP-2, were introduced as suitable candidates for development of Bt based bio-insecticides.

Second part: Expression, isolation and purification of new insecticidal protein

Because of the extensive application of Bt-based products, resistance has been reported in some insects. Many strategies have been employed to improve the efficacy of Bt-based insecticides and to overcome the resistance evolution. Identification of native Bt strains are needed to discover novel toxins, with different mode of action and broader range of insecticidal activity. In the search for novel *cry* genes encoding new toxins within the Iranian Bt strains, a new *cryIIa*-type gene was found in the Bt IE-1 strain. It was named *cryIIa38* (Gene Bank Acc. Number MG584186). The *cryIIa38* gene comprised a 2160 bp open reading frame encoding a protein of 719 amino acids. In the present work, the full-length *cryIIa38* gene was cloned from the genomic DNA extracted from the IE-1 Bt strain. The isolated gene was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. That *cryIIa38* gene encoded an 80-kDa protein, a molecular mass unique amongst the 3D

proteins and common to all the CryII toxins. Trypsin-activation of CryIIa38 resulted in a 50-kDa peptide stable form.

Moreover, the toxicity of a CryIIa38 mutant with a single point mutation (CryIIa38-I116V) was compared with that of CryIIa38 wild-type. The CryIIa38-I116V mutant was generated by site-directed mutagenesis, and exhibits substitution at the position 116, resulting in a single replacement of the Ile¹¹⁶ by Val at domain I. The effect of this amino acid substitution was studied in molecular characterization, insecticidal and cytotoxic activities. The CryIIa38-I116V mutant expression was resulted in 80-kDa protoxin. A band of almost 50-kDa was observed following SDS-PAGE of trypsin activation of CryIIa38-I116V protein.

Third part: Assessment of insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa toxins

According to bioassay results, the purified CryIIa38 protoxin showed high toxicity to *O. nubilalis* and *G. molesta*, low toxicity to *S. exigua* and *S. littoralis*, and non-toxic activity to *H. armigera* first instar larvae. The trypsin activated CryIIa38 was only highly toxic for *G. molesta* larvae and moderately toxic for *O. nubilalis* neonates. Based on the result of cell viability assay, CryIIa38 protein was not toxic for Sf21 cells at the tested concentrations. No statistically significant differences in viability percentage of Sf21 cells was observed after exposure to protoxin and trypsin activated toxin of CryIIa38 protein.

The insecticidal activity of CryIIa38-I116V protoxin and trypsinized protein with a molecular weight of 80 kDa and 50 kDa respectively were determined against *O. nubilalis*, *G. molesta* and *S. exigua* and *S. littoralis* larvae with a concentration of 1000 ng/cm². The CryIIa38-I116V protoxin was toxic for *O. nubilalis* and *G. molesta* neonates while, the trypsin activated constructed mutant lost the toxicity against both of them. Therefore, the data indicate, single point mutation affected the insecticidal activity of CryIIa38 wild-type. Similarly to what had been found in cytotoxic activity of CryIIa38 protein, CryIIa38-I116v protoxin and trypsin activated toxins were not toxic for Sf21 cells.

The molecular characterization, insecticidal and cytotoxic activities of Cry1Ia7 were compared to the closely related Cry1Ia proteins obtained in the present work (the Cry1Ia38 and Cry1Ia38-I116V proteins). Based on our results, protoxin and trypsin activated Cry1Ia7 were toxic to *O. nubilalis*. The result of cell viability assay showed that Cry1Ia7 was not toxic for Sf21 and Hi5 cells at the tested concentrations. No statistically significant differences were observed between viability of Sf21 and Hi5 cells. Only after 48 hours of exposure to the highest concentration of activated Cry1Ia7 (20 µg/ml), a 40% loss of cell viability was observed in both insect cell lines.

In summary, in this research the insecticidal spectrum of different Cry1Ia proteins was assessed and compared. According to our findings, protoxins of Cry1Ia38 and Cry1Ia7 were toxic to *O. nubilalis* and *G. molesta* larvae. But trypsin activated Cry1Ia7 showed no insecticidal activity against *G. molesta* larvae whereas Cry1Ia38 did. Taken together, although there is a high identity between amino acid sequences of the tested Cry1Ia proteins, significant differences were detected in insecticidal activity of the trypsin activated forms of these toxins against *G. molesta* neonates since *G. molesta* first instar larvae were susceptible only to the trypsin activated of Cry1Ia38 wild type.

Forth part: Studying the oligomerization step in mode of action Cry1Ia proteins

Insecticidal activity of Cry Bt toxins relies on the ingestion of parasporal crystalline inclusions to reach to the midgut epithelium. Once ingested by the susceptible larvae, parasporal crystals dissolved by the pH conditions of the midgut and converted to protoxins. The solubilized protoxins are cleaved by host midgut proteases yielding protease resistant core. According to the sequential binding model, after this proteolytic activation, monomers bind to cadherin receptors in the surface of the insect midgut cells. This binding triggers the second proteolytic cleavage that leads to toxin oligomerization, membrane insertion and pore formation. The formation of an oligomeric structure prior to the insertion of the toxin into the insect midgut membrane has been described as a major step necessary for the toxicity process in the mode of action of three domain Cry proteins which compose the Bt parasporal crystal. Due to specific features of CryII proteins, a better understanding of their mode of action is critical for enhancing their efficacy against their target insect pests. In this study, the Cry1Ia oligomer formation and

the dependency of the insecticidal activity of CryIIa on the oligomerization have been determined for the first time.

Since CryII proteins have dual activity against lepidopteran and coleopteran pests, the oligomer formation of CryIIa was studied after incubation of the protein with brush border membrane vesicles (BBMV) of coleopteran susceptible host, *Leptinotarsa decemlineata*, and lepidopteran susceptible *Lobesia botrana*, and non-susceptible *O. nubilalis* insects. Moreover cultured insect cells, Sf21 cell line, as another cell-derived model, was employed in this study. To perform this study, CryIAb has been selected to be used as control because its oligomerization has been reported in several studies. Therefore, Cry toxins oligomerization was studied in two proteins, CryIAb and CryIIa. Our results clearly showed that that CryIAb can oligomerize in the proposed tetramer form (250 kDa molecular weight size) regardless to its host susceptibility, as oligomers were observed after incubation of the trypsinized protein with *O. nubilalis* or *L. botrana* BBMV (susceptible insects), but also with *L. decemlineata* BBMV (non-susceptible insect) and Sf21 cells (non-susceptible cultured cells). But CryIIa toxin formed oligomers only after incubation with *L. decemlineata* BBMV (coleopteran susceptible host) but not following incubation with lepidopteran BBMV or Sf21 cells, regardless to its susceptibility. Based on our results, sequential binding model of the three-domain Bt toxins mode of action, followed by toxin oligomerization, may not be widely generalized for all three-domain Cry family members. These data indicate the feasibility of employing CryIIa toxins (due to their different mode of action) pyramided with other Cry toxins in Bt-based insecticides or transgenic plants, to delay the evolution of insect resistance.

Fifth part: Evaluating the antimicrobial activity of Bt strains

Previously, only the insecticidal properties of Bt attracted extensive attention. However, in recent years, the roles of Bt in plant disease control have been found out. Finding a specific, easily degradable and low cost Bt-based formulation as an alternative to chemical pesticides, for controlling both insect pests and plant diseases, would be highly valuable in biological control.

There are evidences of an antibiotic action of spores and crystals of Bt strains on phytopathogenic fungi and bacteria. In this study the antimicrobial activity of the seven previously characterized Bt strains was assessed against plant pathogens such as the fungus *F. oxysporum* or the bacteria *Erwinia* sp.. Further, chitinase gene, as an important antifungal agent, was traced in the studied Bt strains.

According to our findings, IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp Bt strains possessed exo-chitinase. The endo-chitinase gene was present in AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains. The antifungal activity of the seven Bt strains was assessed against *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* causing root rot in tomato plants, by the dual culture method. The phytopathogenic fungus grew on the surface of Potato Dextrose Agar plate and the presence of bacterial plugs did not inhibit the fungus growth. As a result, the mixture of spores and crystals of the selected Bt strains showed no antifungal activity against pathogenic fungus. There was no correlation between the presence of chitinase genes and antifungal activity. This could be explained by a low transcription of the gene or un-transcribed sequences.

The antibacterial activity of the seven selected Bt strains was tested against Gram negative plant pathogenic bacterium, *Erwinia* sp. by the agar plug diffusion method. The phytopathogenic bacteria grew on the whole surface of Nutrient Agar plate and no clear zone around the bacterial plugs was observed indicating that the studied Bt strains could not control *Erwinia* sp., which causes soft rot disease. The antimicrobial activity of different Bt strains might be a consequence of the adaptation of the strain to its habitat. Therefore, because most of our studied lepidopteran toxic Bt strains (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp) had been isolated from infected or dead insect larvae, most probably they did not show any antimicrobial activity, against none of the soil-born phytopathogen agents used (*F. oxysporum* subsp. *lycopersici* and *Erwinia* spp).

Sixth part: Determining the biochemical effects of Bt strains on plant cells

It has been demonstrated that Bt strains have potential to promote plant growth, to improve nutrient uptake and to protect plants under abiotic and biotic stress conditions. Different Bt strains can protect the plants from phytopathogens through siderophores

production, chitinase activity, increasing the activities of plant resistance enzymes and induction of systemic resistance. Although pesticides based on Bt have been widely used for years, little is known about the interaction between plant cells and Bt strains. The aim of this part of the thesis was to study plant-Bt interaction at the cellular level, by focussing on the effect of Bt inoculation on plant anti-oxidant status.

When plants are subjected to biotic and abiotic stress, there is a production of activated oxygen species that lead to plant cells damage. Therefore, antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and ascorbate peroxidase enzymes are needed to scavenge the reactive oxygen species and restore the plant to the normal conditions. In the present work, as a result, the activity of the studied antioxidant enzymes in both treatments (spraying the phylloplane and inoculating the rhizosphere) increased significantly compared to non-treated plants, most probably to reduce oxidative stress.

When plants encounter with biotic stress (such as pathogen invasion), the oxidative bursts (superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals) occur. The oxidative burst triggers plant defence in two phase; phase one is non-specific and happens immediately after pathogen recognition, but phase two is prolonged and leads to disease resistance. In the case of inoculating the tomato plants with mixture of spores and crystals of AzLp Bt strain in both treatments, these two phase were observed.

Inoculation of the phylloplane and rhizosphere tomato plants with Bt suspension (mixture of spores and crystals) significantly improved the accumulation of protein, carbohydrate, proline and phenolic contents in tomato leaves compared to the non-inoculated treatment. Non-enzymatic components such as proline act as a main defence against reactive oxygen species. Therefore, increasing the phenolic, carbohydrate, protein and proline contents in treated tomato leaves, decreases the oxidative damage. Altogether according to our observations, the impact of Bt suspension on tomato cells leads to physiological and biochemical responses, and eventually increased the activity of antioxidant enzymes and induced resistance to biotic stress.

To summarize, our investigation has deeply characterized some selected Iranian Bt isolates by using different complementary techniques. The characterization was performed based on the protein profile, gene content, proteomics analysis, insecticidal

and cytotoxic spectrum of activity focusing on four lepidopteran families (Noctuidae, Pyralidae, Tortricidae and Crambidae) and β -exotoxin production. These comprehensive characterizations have introduced three highly potent Bt strains for controlling lepidopteran pests. Following the objectives of this thesis, the effect of selected Bt toxins were evaluated on animal cells (insect cell lines), microbial cells (*Erwinia* sp. and *Fusarium* cultures) and plant cells (tomato plants). With the aim of finding novel insecticidal activities, the new Bt strains were explored looking for new *cry* genes. As a result, a new Cry1Ia gene, the *cry1Ia38* gene, was discovered, and this gene and a mutant generated were cloned and expressed. The insecticidal and cytotoxic activity of Cry1Ia proteins were assessed against different lepidopteran species and insect cell lines. According to our bioassays results, Cry1Ia38 in the form of protoxin or of trypsin activated toxin has a great potential in controlling the lepidopteran pest *G. molesta*. Ultimately, molecular biology studies were performed to study the occurrence of an oligomerization step in the mode of action of Cry1Ia protein. Our findings clearly demonstrated that oligomerization is not a necessary step in toxicity of Cry1Ia proteins.

Conclusions:

- The insecticidal activity of 130 Iranian Bt strains isolated from soil and infected larvae was screened against *P. interpunctella* second instar larvae. Few Bt strains (7 out of 130: IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, DCf and MCh) were active against this pest.
- To study and predict the insecticidal potency of newly isolated Bt strains, different complementary characterization approaches were carried out: *in vivo* and *in vitro* toxicity assays, protein profiling, proteomics analysis, gene content identification and β -exotoxin production.
- Due to high toxicity towards different lepidopteran insect larvae and cell lines, the presence of the insecticidal proteins, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Da, and the absence of β -exotoxin, AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains were proposed as suitable candidates for development of future Bt based bio-insecticides.
- The studied Bt strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, RM and KhF, could not control the plant pathogenic bacterium *Erwinia* sp. that causes soft rot disease.
- IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp Bt strains possessed exo-chitinase and the endo-chitinase gene was present in AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains. Though, the mixture of spores and crystals of Bt strains showed no antifungal activity against the pathogenic fungus, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*, causing root rot in tomato plants. No correlation between the presence of chitinase genes and antifungal activity was observed.
- The tomato plants inoculation with AzLp strain suspension reduced the oxidative stress through increased significantly antioxidant enzyme activities (catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and ascorbate peroxidase) compared to non-treated plants. This was observed in two type of treatments (spraying the phylloplane and inoculating the rhizosphere).
- Inoculation of the phylloplane and rhizosphere tomato plants with Bt suspension (mixture of spores and crystals) significantly improved the accumulation of protein, carbohydrate, proline and phenolic contents in tomato leaves compared to non-inoculated treatment.

- The impact of Bt suspension on tomato cells led to physiological and biochemical responses, and eventually increased the activity of antioxidant enzymes and induced systemic resistance in plants to possible phytopathogen invasions.
- The *cryIIa38* gene was isolated from IE-1 Bt strains and successfully cloned and expressed in *E. coli* cells.
- The protoxins of CryIIa38 protein have a great potential for controlling of *Ostrinia nubilalis* and *Grapholita molesta* first instar larvae.
- The protoxin of CryIIa38-II16V, generated by site-directed mutagenesis, was toxic for *G. molesta* first instar larvae, while the trypsin activated CryIIa38-II16V lost its toxicity toward this pest. The single point mutation affected the insecticidal activity of CryIIa38 wild-type to *G. molesta* larvae.
- The protoxin of CryIIa7 was toxic to *O. nubilalis* and *G. molesta* larvae. After 48 hours exposure to the highest concentration of activated CryIIa7 (20 µg/ml), a 40% loss of cell viability was observed in Sf21 and Hi5 lepidopteran cell lines.
- The CryIIa toxin formed oligomers only after incubation with *L. decemlineata* BBMV (coleopteran susceptible host) and no CryIIa oligomeric structure was found following incubation with Lepidopteran BBMV or insect cell line regardless to its susceptibility. Therefore, it seems that oligomerization, as an important step for toxicity in the sequential binding model, may not be part of the mode of action of the CryIIa proteins.

References:

1. **Aebi, H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods. Enzymol.* 105: 121-126.
2. **Ainsworth EA. And Gillespie.** 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4):875-878.
3. **Beauchamp C. and Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
4. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
5. **Carillo, P., Gibbon, Y.,** 2011. Protocol: Extraction and Determination of Proline. Prometheus Wiki01/2011. <http://www.researchgate.net/publication/211353600> PROTOCOL Extraction and determination of proline.
6. **Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H and Ferré J.** 2017. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins* 9:139-158.
7. **Dreywood R.** 1946. Qualitative test for earbohydrate material. *Industrial attd Engineeritig Chemistry - Atialytical Edition* 18, 499.
8. **Escriche B, Silva FS, Ferré J.** 1995. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal protein. *J. Invertebr. Pathol.* 65:318–320.
9. **Estela A, Escriche B, Ferré J.** 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Environ Microbiol* 70:1378–1384.
10. **Ferrandis MD, Juárez-Pérez VM, Frutos R, Bel Y, Ferré J.** 1999. Distribution of cryI, cryII and cryV Genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Syst Appl Microbiol* 22:179–185.
11. **Hernández CS, Martínez C, Porcar M, Caballero P, Ferré J.** 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *J Invertebr Pathol* 82:57-62.
12. **Hernández-Martínez P., Vera-Velasco NM., Martínez-Solís M., Ghislain M., Ferré J. and Escriche B.** 2014. Shared binding sites for the *Bacillus thuringiensis*

- proteins Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa in the African sweet potato pest *Cylas puncticollis* (Brentidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 80(24): 7545-7550.
13. **Hernández-Martínez, P., Ferré, J., and Escriche, B.** 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 245–250.
 14. **Kar, M. and Mishra, D.** 1975. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
 15. **Khorramnejad A., Bel Y., Hernández-Martínez P., Talaei-Hassanloui R. and Escriche B.** 2018. Insecticidal activity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia protein. *GMOs in Integrated Plant Protection IOBC-WPRS Bulletin.* 131: 56-63.
 16. **Knaak, N. Rohr, A.A. and Fiuza, L.M.** In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* 2007, 38, 526–530.
 17. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
 18. **Martínez, C., M. Porcar, A. López, I. Ruiz de Escudero, F. J. Pérez-Llarena, & P. Caballero.** 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol. Exp. Appl.* 111:71-77.
 19. **Ocelotl J., Sánchez J., Arroyo R., Gracia-Gómez BI., Gómez I., Unnithan GC., Tabashnik BE., Bravo A. and Soberón M.** 2015. Binding and oligomerization of modified and native Bt toxins in resistance and susceptible pink bollworm. *PlosOne* 10 (12).
 20. **Portugal L., Gringorten JL., Caputo GF., Soberón M., Muñoz-Garay C. and Bravo A.** 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides* 53:292-299.
 21. **Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. and Soldatini, GF.** 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54: 2529-2540.
 22. **Sayed, A.H., Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M., Escriche, B., Wright, D.J., Crickmore, N.,** 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella*

xylostella to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. Appl. Environ. Microbiol. 11, 6863–6868.

23. **Wang, WJ., Zheng, LP., Wu, JY. And Tan, RX.** 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxusyunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.
24. **Wolfersberger MG, Luthy P, Parenti P, Parenti P, Sacchi VF, Giordana B, Hanozet GM.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 86A:301–308.



University of Tehran

College of Agriculture & Natural Resources

Department of Plant Protection



University of Valencia

Faculty of Biological Science

Department of Genetics

Structural and functional diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins on animal, plant and microbial cells

By

Ayda Khorramnejad

Supervisors

Dr. Reza Talaie-Hassanloui

Dr. Baltasar Escriche Soler

Advisor

Dr. Yolanda Bel Cortes

A thesis submitted to the graduate studies office in partial fulfilment of the requirements for the degree of the international joint supervision of Doctor of Philosophy in

Agricultural Entomology (Ecology and Biological Control) from University of Tehran

and

Biotechnology and Biomedicine from University of Valencia

November 2018

Acknowledgement

First and foremost, I would like to thank God for giving me the strength, knowledge, ability and opportunity to undertake this research study and to persevere and complete it satisfactorily.

I express my deep sense of gratitude to Dr. Reza Talaei-Hassanloui for his help and support. His simplicity, immense patience, perfection, encouragement and positive attitude have always kept me motivated throughout this study as well as my life. I am extremely grateful for his confidence in me and the freedom he gave for me to work.

I express my sincere thanks to Dr. Baltasar Escriche Soler for accepting me as his student and giving me the opportunity of working in his lab. Thanks for your valuable advice, excellent guidance and encouragement.

In my journey towards this degree, I have found a teacher, a friend, an inspiration and a role model, my dear Dr. Yolanda Bel Cortes. There are no words to describe how much you really mean to me. Without your heartfelt support this achievement would not have been possible.

This study would not have come to a successful completion, without the help I received from Dr. Vahid Hosseinaveh. His scientific attitude had always inspired me.

I would also like to thank my committee members; Dr. Salehi Jouzani, Dr. Karimi, Dr. Azimi, Dr. Talebi, Dr. Behboudi and Dr. Mehrabani, thanks for your brilliant comments and suggestions.

My acknowledgement would be incomplete without thanking the biggest source of my strength, my family. Without your endless love and unconditional support; I would not have been where I am today and what I am today. I love you beyond what words can express. As the only thing that I have in my hand, this dissertation is dedicated to you with all my heart and love respectfully.

I would like to express my special appreciation and thanks to my dear friends, Zeinab, Pegah, Yasi and Shirin; you are the constant reservoir of cheers at all those times when I needed it the most.

All friends and lab mates at the University of Tehran are also acknowledged for providing a pleasant and friendly environment to work. Each and every one of them stays close to my heart.

I would like to thank all my friends at the University of Valencia, for all those cheerful moments that I shared with them. They made my stay in Valencia memorable. I was so lucky to be a part of CBP team such an amazing group filled with learning experiences.

A very special thanks to Dr. Juan Ferre for his care and kindness towards me.

Many thanks to Dr. Patricia Hernández-Martínez for her concern not only towards my academics but also to my personal life.

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is one of the most successful entomopathogens in biological control of pests. The identification of new Bt strains is a topical issue in order to discover novel Bt toxins to broaden the range of insecticidal activities and to manage insect resistance. Due to the importance of Bt, Iranian Bt strains were screened according to their toxicity against *Plodia interpunctella*. Strains with diverse larvicidal activity were characterized according to their gene content, protein composition, the spectrum of insecticidal and cytotoxic activity against lepidopteran pests, the production of β -exotoxin, and the anti-microbial activity and biochemical effects on plant cells. As a result, due to high toxicity exhibited towards lepidopteran insect larvae and cell lines, and to the absence of β -exotoxin, the AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains were introduced as suitable candidates for development of new Bt based bio-insecticides. The inoculation of tomato plants with spore and crystal mixture of the selected Bt strains, increased the activity of antioxidant enzymes and induced resistance to probable pathogen invasions and to biotic and abiotic stress in the tomato plants, but no antimicrobial activities were recorded against phytopathogens such as the fungus *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* and or the bacteria *Erwinia* sp.

The gene content analyses of the highly insecticidal Bt strains conducted to the isolation of the *cryIIa38* gene from the IE-1 Bt strain. Subsequently, the gene was successfully cloned. Based on our results, *CryIIa38* protein has a great potential for controlling *Ostrinia nubilalis* and *Grapholita molesta*. Due to the specific features of the CryII proteins, the formation of an oligomeric structure formed by CryIIa toxin monomers and the association between oligomerization and insecticidal activity of this protein, have been investigated. Based on our results, toxin oligomerization may not be widely generalized for the CryIIa toxins.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, insect cell line, LC-MS/MS, CryIIa proteins, oligomer formation, anti-microbial activity, plant biochemical response.

TABLE OF CONTENTS

Chapter one	13
Introduction.....	13
1.1. Introduction	14
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
1.2. Nomenclature, discovering and classification of Bt toxins.....	20
1.2.1. Cry Toxins.....	22
1.2.2. Cyt toxins	23
1.2.3. Parasporin Toxins	24
1.2.4. Secreted toxins	25
1.2.5. Other virulence factors of Bt strains	26
1.3. Cry toxins mode of action	29
1.4. The role of Bt in controlling plant diseases	32
1.5. Effect of Bt on plant cells.....	33
Chapter Two	35
Isolation and characterization of <i>B. thuringiensis</i> strains.....	35
2.1. Introduction	36
Materials and Methods.....	43
2.1. Bacterial strains.....	43
2.2. Insects.....	44
2.3. Insect cell lines.....	44
2.4. Sample collection	45
2.5. Isolation of Bt strains	45
2.6. Storage of bacterial cultures.....	46
2.7. Determination of the bacterial morphology	47
2.8. Gram staining	48
2.9. Catalase test.....	49
2.10. Identification of <i>Bacillus</i> spp. group.....	49
2.11. Screening of Bt isolates based on the toxicity on <i>P. interpunctella</i>	50
2.12. Comparison of protein profiles of Bt strains.....	51
2.13. Determination of crystal protein composition of Bt strains by LC-MS/MS.....	53

2.14. Determination of gene content	55
2.14.1. DNA extraction	55
2.14.2. Primer designing	56
2.14.3. Polymerase Chain Reactions.....	58
2.15. β -exotoxin production	60
2.16. Evaluation the spectrum of insecticidal activity	60
2.16.1. Insect bioassay	61
2.17. Cell viability assay	61
2.3. Results and discussion	64
2.3.1. Isolation of Bt strains	64
2.3.2. Preliminary screening of Bt strains	65
2.3.3. Comparison of protein profile of Bt strains	67
2.3.4. Determination of crystal protein composition of Bt strains by LC-MS/MS.....	68
2.3.5. Determination of gene content.....	71
2.3.6. Evaluation of the insecticidal activity spectrum of Bt strains.....	73
2.3.7 Evaluation the cytotoxic activity of Bt strains	76
2.3.8. Examination of β -exotoxin production	80
Chapter Three	83
Screening and cloning of the possible novel Bt genes.....	83
3.1. Introduction	84
Materials and Methods	87
3.1. Finding a candidate gene for cloning	87
3.1.1. <i>cryIAg</i> gene.....	88
3.1.2. <i>cryIHa</i> and <i>cryIHb</i> genes	96
3.1.3. <i>cryIG</i> gene	97
3.1.4. <i>cryIAd</i> gene.....	99
3.1.5. <i>cryIIa</i> gene.....	99
3.1.6. Cloning of <i>cryIIa38</i> gene	103
3.2.6.1. Selecting the appropriate vector.....	103
3.2.6.2. pGEM-Teasy vector	108
3.2.6.3. The expression vector pET-30a (+)	112
3.2.7. Site-directed mutagenesis.....	114

3.2.7.1. Primer designing for site-directed mutagenesis	116
3.2.7.2. Polymerase chain reaction for site-directed mutagenesis	117
3.2.7.3. Removal of maternal plasmids.....	118
3.2.7.4. Transformation of the recombinant vector.....	118
3.3. Results and Discussion.....	118
3.3.1. <i>cryIAg</i> gene.....	118
3.3.2 <i>cryIHa</i> , <i>cryIHb</i> , <i>cryIG</i> and <i>cryIAd</i> genes	124
3.3.3. <i>cryIIa</i> gene.....	125
3.3.4. Cloning of <i>cryIIa38</i> gene	127
3.3.5. Site-directed mutagenesis.....	128
Chapter Four	131
Assessment of insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa toxins	131
4.1. Introduction	132
4.2. Materials and Methods.....	136
4.2.1. The expression, purification and activation of the CryIIa38 protein.....	136
4.2.2. Assessment of the insecticidal activity of CryIIa38 protein.....	137
4.2.2.1 Bioassays.....	137
4.2.3. Cell viability assay	137
4.2.4. Expression, purification and activation of the CryIIa38-II16V mutant.....	138
4.2.5. Assessment of the insecticidal activity of CryIIa38-II16V	138
4.2.5.1. Bioassay	138
4.2.5.2. Cell viability assay	138
4.2.6. Expression, purification and activation of CryIIa7 protein	139
4.3. Results and Discussion.....	140
4.3.1. Expression, purification and activation of CryIIa38 protein	140
4.3.2. The insecticidal activity CryIIa38 toxin.....	141
4.3.3. The cytotoxic activity of CryIIa38 protein against Sf21 cells.....	142
4.3.4. Expression, purification and activation of the CryIIa38-II16V protein.....	144
4.3.5. The insecticidal activity of CryIIa38-II16V toxin.....	145
4.3.6. The cytotoxic activity of CryIIa38-II16V protein.....	146
4.3.8. Expression, purification and activation of CryIIa7 protein	148
4.3.9. The insecticidal activity of CryIIa7 toxin.....	148

4.3.10. The cytotoxic activity of Cry1Ia7 protein	149
Chapter Five Association between oligomerization and insecticidal activity	157
5.1. Introduction	158
5.2. Materials and Methods	162
5.2.1 Preparation of Cry1Ia and Cry1Ab proteins	162
5.2.2. Insects.....	163
5.2.3. Insect dissection and BBMV preparation	164
5.2.4 Biotin labelling.....	165
5.2.5. Studying the oligomeric structures using Sf21 cell line.....	166
5.2.6. Studying the oligomeric structures using BBMV	167
5.3. Results and Discussion.....	168
3.1.3 Formation of oligomeric structures in Cry1Ia protein	168
5.3. Preparation of Cry1Ia and Cry1Ab proteins	169
5.3.3. Biotin labelling of Cry1Ia	170
5.3.4. Formation of oligomeric structures using Sf21 cell line.....	170
5.3.3. Formation of oligomeric structures using BBMV	172
Chapter Six Evaluation of Bt strains antimicrobial activity.....	180
6.1. Introduction	181
6.2. Materials and Methods	183
6.2.1. The evaluation of antifungal activity	183
6.2.1.1. Polymerase chain reaction to detect chitinase genes.....	184
6.2.1.2. Dual culture method.....	185
6.2.2. Antibacterial activity of Bt strains	186
6.3. Results and Discussion.....	186
6.3.1. Antifungal activity of Bt strains	187
6.3.2. Antibacterial activity of Bt strains	191
Chapter seven Biochemical and physiological changes in tomato plants.....	193
7.1. Introduction	194
7.2. Materials and Methods	199
7.2.1. Growing the tomato plants	199
7.2.2. Inoculation of tomato and soil with Bt suspension	199
7.2.3. Sampling	200

7.2.4. Studying the enzymatic and non-enzymatic parameters.....	201
7.2.4.1. Activity of the catalase enzyme	201
7.2.4.2. Activity of the enzyme guaiacol peroxidase	202
7.2.4.3. Ascorbate peroxidase enzyme activity.....	203
7.2.4.4 Enzyme activity of superoxide dismutase.....	204
7.2.4.5. Activity of polyphenol oxidase enzyme.....	205
7.2.4.6. Activity of the Phenyl Alanine Ammonia-Lyase.....	205
7.2.4.7. Total phenolic content.....	206
7.2.4.8. Proline content	207
7.2.4.9. Protein content	208
7.2.4.10. Soluble Carbohydrates	208
7.3. Results and Discussion.....	208
7.3.1. Catalase activity	209
7.3.2. Activity of ascorbate peroxidase enzyme	211
7.3.3. Phenylalanine ammonia-lyase enzyme activity	212
7.3.4. Polyphenol oxidase enzyme activity	214
7.3.5. Phenolic content.....	215
7.3.6. Soluble Carbohydrate Concentration	216
7.3.7. Total protein content	218
7.3.8. Proline concentration	220
Chapter Eight General conclusions and suggestions.....	227
8.1. Overall conclusion	228
8.2. Suggestions	233
References.....	234

List of figures

Fig. 1. 1. Different crystal morphology in Bt strains.....	20
Fig. 1. 2. Three-dimensional structure of Cry2Aa toxin.....	22
Fig. 1. 3. Three-dimensional structure of Cyt1Aa toxin.....	24
Fig. 1. 4. Representation of the current models of Cry toxin action.....	30
Fig. 1. 5. Sequential model of Cry toxins mode of action	31
Fig. 1. 6. Receptors molecules of Cry1A proteins.....	32
Fig. 2. 1. Identification key of the major groups of <i>Bacillus</i> spp.	48
Fig. 2. 2. The morphological characteristics of <i>Bacillus</i> spp.....	50
Fig. 2. 3. Transformation of tetrazolium salt into the formazan compound	62
Fig. 2. 4. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins.....	68
Fig. 2. 5. Susceptibility of UCR-SE, HzGUT, Hi5 and Sf21 cells	77
Fig. 2. 6. Dose-response curves of Sf21 cell viability	78
Fig. 2. 7. Sf21 cells treated with activated toxin of AzLp, IE-2 and IP-2 strains	79
Fig. 3. 1. Different steps for performing the genome walking technique.....	90
Fig. 3. 2. Adaptors and blockers used in genome walking technique.....	92
Fig. 3. 3. The map of pGEM-Teasy vector (www.promega.com).....	105
Fig. 3. 4. The map of pET-30a(+) vector (www.addgene.org).....	106
Fig. 3. 5. Different steps of site-directed mutagenesis (www.agilent.com).	115
Fig. 3. 6. The results of polymerase chain reaction for cry1Ag gene amplification....	120
Fig. 3. 7. The first (A) and the second (B) PCR in genome walking.....	121
Fig. 3. 8. Digestion of PCR products of amplification of cry1Ag gene	123
Fig. 3. 9. The amplification of the cry1I gene with three pairs of primer.	126
Fig. 3. 10. The results of the first (A) and the second (B) PCR.....	126
Fig. 3. 11. The result of the colony PCR in the recombinant pET30a-cry1Ia38	127
Fig. 3. 12. The result of double digestion of recombinant pET30a-Cry1Ia38 vector...	128
Fig. 3. 13. The recombinant pET30a-cry1Ia38 vector.....	129
Fig. 4. 1. The three-dimensional structure of Cry1Aa toxin.....	133
Fig. 4. 2. Expression, purification and activation of Cry1Ia38 protein	141
Fig. 4. 3. Susceptibility of Sf21 cells to prot. and act. Cry1Ia38 protein	143
Fig. 4. 4. Sf21 cells after treatment with Cry1Ia38 protoxin and activated toxins	144

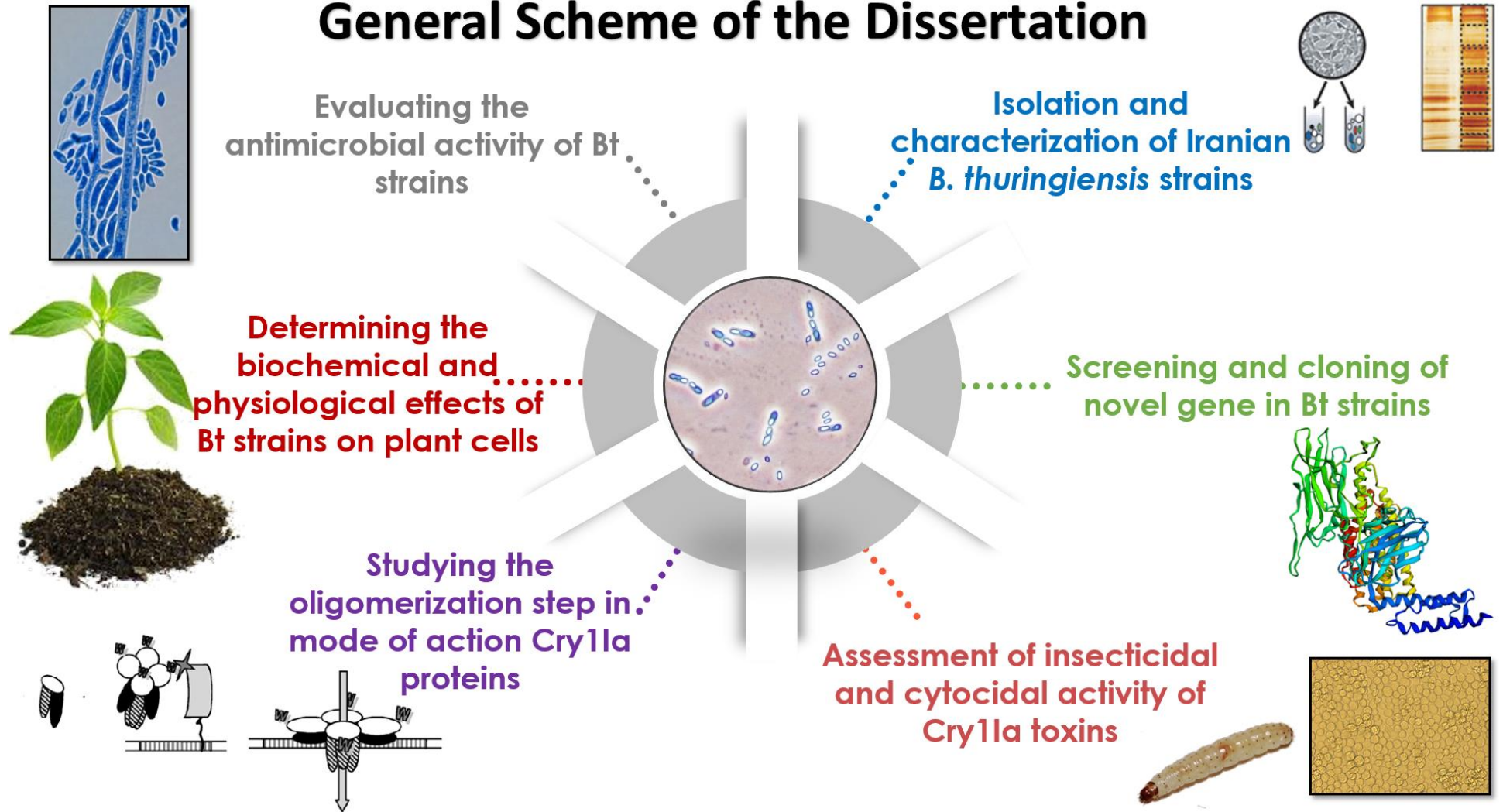
Fig. 4. 5. Expression, purification and activation of the Cry1Ia38-II116V protein.....	145
Fig. 4. 6. Susceptibility of Sf21 cells to prot. and act. Cry1Ia38-II116V	147
Fig. 4. 7. Sf21 cells after treatment with Cry1Ia38-II116V	147
Fig. 4. 8. Expression, purification and activation of Cry1Ia7 protein	148
Fig. 4. 9. Susceptibility of Sf21 and Hi5 cells to trypsin activated Cry1Ia7 protein. ...	150
Fig. 4. 10. The morphological changes of Hi5 (A) and Sf21 (B) cells.....	151
Fig. 4. 11. The alignment of the amino acid sequences.....	154
Fig. 4. 12. Comparison of the 3D structure of Bt toxins.....	155
Fig. 5. 1. Expression and purification of Cry toxins.....	169
Fig. 5. 2. The result of Cry1Ia biotin labelling.	170
Fig. 5. 3. Oligomeric structure formation	171
Fig. 5. 4. Oligomerization of Cry1Ab and Cry1Ia toxins.....	172
Fig. 5. 5. Oligomer formation of Cry1Ab and Cry1Ia toxins	174
Fig. 5. 6. Oligomer formation of Cry1Ab and Cry1Ia toxins	175
Fig. 6. 1. Antifungal activity of Bt strains.	188
Fig. 6. 2. The amplification of endo-chitinase and exo-chitinase genes.....	190
Fig. 6. 3. Antibacterial activity of Bt strains.....	191
Fig. 7. 1. Pots of tomato plants.	200
Fig. 7. 2. The average of catalase activity	210
Fig. 7. 3. The average of ascorbate peroxidase activity.....	211
Fig. 7. 4. The average of phenylalanine ammonia-lysis activity.....	213
Fig. 7. 5. The average of polyphenol oxidase enzyme activity	214
Fig. 7. 6. The average of total phenolic content	216
Fig. 7. 7. The average of concentration of soluble carbohydrates	217
Fig. 7. 8. The average of total protein concentration.....	219
Fig. 7. 9. The average of total proline concentration.....	221

List of tables

Table 2. 1. Names of used insect cell lines.....	44
Table 2. 2. Confidence intervals for protein score.....	54
Table 2. 3. The list of primers used in this study.....	57
Table 2. 4. The amounts and concentration of used materials for PCR reaction mix. ...	59
Table 2. 5. Thermal conditions of polymerase chain reaction.....	59
Table 2. 6. Probit analysis.....	65
Table 2. 7. Classification of Bt strains.....	65
Table 2. 8. Toxicity of spore and crystal mixture.....	66
Table 2. 9. Pesticidal crystal proteins identified by LC-MS/MS analysis.....	70
Table 2. 10. Distribution of cry, cyt, vip, sip and ps genes in Bt strains.....	72
Table 2. 11. Insecticidal activity of the seven selected Bt Iranian strains.....	75
Table 2. 12. Effective concentration of trypsin activated proteins.....	79
Table 2. 13. Determination of beta-exotoxin production in Bt strains.....	81
Table 3. 1. Amounts and concentrations of consumed materials in the first PCR.....	93
Table 3. 2. PCR conditions for performing the first PCR in genome walking.....	94
Table 3. 3. The list of specific restriction enzymes.....	96
Table 3. 4. Primers Designed for the amplification of <i>cry1Ha</i> and <i>cry1Hb</i> genes.....	97
Table 3. 5. Amounts and concentrations of consumed materials.....	98
Table 3. 6. PCR conditions for amplification of <i>cry1G</i> gene.....	98
Table 3. 7. The designed primers for amplification of <i>cry1Ia</i> gene.....	100
Table 3. 8. The primers used in <i>cry1Ia</i> nested PCR.....	101
Table 3. 9. PCR reaction mix.....	101
Table 3. 10. PCR conditions for first PCR in genome walking.....	102
Table 3. 11. PCR conditions for second PCR in genome walking.....	102
Table 3. 12. Primers used in the <i>cry1Ia38</i> gene amplification for cloning.....	107
Table 3. 13. The amounts and concentration of used materials.....	107
Table 3. 14. PCR condition for amplification of <i>cry1Ia38</i> gene.....	108
Table 3. 15. Amounts and concentrations of used materials to add the poly A tail.	108
Table 3. 16. pGEM-Teasy vector ligation.....	109

Table 3. 17. The screening of recombinant colonies by PCR.....	110
Table 3. 18. PCR condition for performing the colony PCR.....	111
Table 3. 19. Digestion of recombinant vector pGEM-Teasy.....	112
Table 3. 20. Double digestion of pET-30a(+) vector.....	113
Table 3. 21. pET-30a(+) vector insertion reaction.	114
Table 3. 22. Primers used for site-directed mutagenesis.	116
Table 3. 23. Site-directed mutagenesis PCR.....	117
Table 3. 24. PCR condition for site-directed mutagenesis.	117
Table 3. 25. Information and the sequences of the peptides.....	119
Table 3. 26. Information on candidate proteins for cloning.	124

General Scheme of the Dissertation



CHAPTER ONE
INTRODUCTION

1.1. INTRODUCTION

Due to deleterious effects of chemical insecticides on ecosystem and non-target organisms, implementation of biological control agents has received considerable attention. Amongst biological control agents (predators, parasitoid and insect pathogens), remarkable interest has been devoted to entomopathogens, because of their potential for controlling agricultural and household pests, vectors of human and animal diseases without introducing non-degradable material into environment. Insecticidal bacteria with an invasive power to colonize the gut, especially members of the two families of Bacillaceae and Streptococcaceae belonging to the group of gram-positive bacteria, have attracted the most attention. *Bacillus thuringiensis* (Bt), a gram positive, aerobic or anaerobic and endospore forming bacterium, has been proven to be the most successful and commercially used microbial control agent (Federici, 1991; Raymond et al., 2010). Bt based insecticides or transgenic crops expressing Bt toxins are widely used as an alternative to pesticides and chemical agents (Bravo et al., 2011). As a result, the importance of Bt in the microbial control of pests, is the subject of this study.

Bt produces parasporal crystal proteins that are toxic for many insects, nematodes, mites, protozoa and human cancer cells (Schnepf et al. 1998; van Frankenhuyzen 2009; Ohba et al. 2009). Also, this bacterium produces secreted proteins during the vegetative phase of its growth stage, like Vip and Sip proteins (Palma et al., 2014; Chakroun et al., 2016). Due to the specificity, insecticidal activity and safety of Bt toxins for the environment and other non-target organisms, many studies around the world have focused on isolation of this bacterium from different environments and sources (Bel et al. 1997; Bravo et al., 1998; Uribe et al., 2003; Hernández et al., 2005; Berón and Salerno 2006; Thammasittirong and Attathom 2008; Seifinejad et al., 2008; Vidal-Quist et al., 2009; Djenane et al., 2017). However, the extensive and non-standard use of Bt-based products has led to the emergence of resistance in insect pests against Bt toxins (Ferré et al., 1995). Therefore, isolation and characterization of native Bt strains by the aim of finding new toxins with new insecticidal activity or a broader range of insecticidal activity seems necessary to manage the insect resistance problem (Ferré et al., 1995; Juárez-Pérez et al., 1997).

For this reason, this study firstly focuses on the isolation of Iranian Bt strains from dead and diseased larvae, as well as from soil of forest, fruit gardens, agricultural field and natural vegetation areas. After the initial screening of the Bt strains, the toxicity of Bt strains was determined based on the insecticidal activity against the second instar larvae of Indian meal moth (*Plodia interpunctella*). Various methods have been used to characterize Iranian Bt strains, to provide comprehensive information on the selected strains.

In many studies on the identification and characterization of Bt strain, polymerase chain reaction (PCR)-based techniques are used as a tool for identification of gene content and prediction of insecticidal activity of Bt strains (Juárez-Pérez et al., 1997; Ferrandis et al., 1999). In this thesis, the gene content of Bt strains was determined by polymerase chain reaction. However this quick and accurate technique is disable to indicate the expression level of detected genes (Porcar and Caballero 2000), so protein profile, resulted from SDS-PAGE analysis, can confirm the expression of the detected genes, though multiple toxins may have similar molecular masses. On the other hand, the relative proportion of each protein in parasporal crystals plays an important role in prediction of insecticidal potency of the Bt strain. Therefore LC/MS-MS analysis can detect protein composition of Bt strains. By considering the interaction between different toxins produced by a strain in insect midgut, bioassays provide complementary characterization information. Moreover, *in vitro* toxicity assays with insect cell lines can be used as a rapid means of characterization of Bt strains insecticidal activity, as it has been employed previously to predict different Bt toxins toxicity. On the other hand, the incorporation of *in vitro* techniques, using different insect cell lines, with insect bioassays, promotes toxin activity screening. Due to the money, time and material costs associated to insect rearing and time-consuming characteristics of insect bioassays, cell-based assays have been employed for toxicity characterization of Bt strains or toxins (Kwa et al., 1998; Gringorten et al., 1999; Willcoxon et al., 2016). Moreover, the use of insect cell lines allows researchers to work with insect species without considering regulatory restrictions or prohibitions. In this study, all the mentioned methods were employed to thoroughly investigate Bt strains.

In evaluating the characteristics of Bt strains, the determination of β -exotoxin production is of particular importance, since the production of this analogue adenosine triphosphate (ATP), is an essential step before commercialization of Bt strains. Therefore, in the last step of characterization, the production of non-proteinaceous β -exotoxin was studied in all the selected Bt strains.

Therefore, in the first part of this thesis, all described methods were used to determine the characteristics of selected Bt strains, with a comprehensive information on the **gene content**, the **protein profile** and **crystal protein composition**, the **spectrum of insecticidal activity**, **cytotoxic activity** and **β -exotoxin production**.

Different strategies have been developed to improve the efficiency of Bt-based insecticides, to maximize the effect of Bt toxins, to overcome or at least to delay the insect resistance to Bt toxins. Therefore, the use of a combination of multiple Bt toxins, (if possible with a different mode of action) is highly recommended. The experiments in the second part of this thesis have been focused on the introduction of a new gene (*cryIIa38*) in one of the Iranian strains of Bt. Therefore, in the third part of the dissertation, after performing the gene cloning, the expression, extraction and purification of the *CryIIa38* protein were carried out. Later the insecticidal and cytotoxic activity of the expressed gene (*cryIIa38*) were evaluated. The reason for choosing this gene was the unique features of *cryII* genes family. Among the characterized cry genes, the cryII family has unique traits: (a) these genes are usually silent in Bt strains but can be expressed in *Escherichia coli* cultures, (b) CryII-type proteins do not accumulate in crystals, but because of their similar structure to other CryI proteins, were classified in this group, (c) CryII protoxins have a molecular weight of 70 to 81 kDa (usually, the molecular weight of CryI protoxins is about 130 kDa) and (d) they are toxic for lepidopteran and coleopteran pests (Tailor et al., 1992; Choi et al., 2000). Therefore, in the fourth chapter of this thesis, the insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa proteins were studied.

It is generally accepted that for the mode of action of Bt Cry proteins, the parasporal crystal inclusions have to be ingested by the susceptible host. The ingested Cry toxins dissolve in the alkaline environment of the gut, thereby releasing soluble protoxins. The inactive Cry protoxins are then cleaved at specific sites by midgut proteases yielding active protease-resistant fragments of about 60 kDa (Schnepf et al., 1998; Bravo et al.,

2007). In the sequential binding model of Bt toxins mode of action, Bt toxins sequentially interact with two different receptor molecules (Bravo et al., 2004). Receptors for Bt Cry proteins are located on the apical microvilli membrane of the midgut epithelium columnar cells. The interaction of Cry toxin with its primary receptor (210 kDa membrane-bound cadherin protein) facilitates further proteolytic cleavage of the N-terminal, removing helix α -1; this cleavage induces the formation of an oligomeric pre-pore that is membrane insertion competent (Gómez et al., 2002). The pre-pore oligomer then binds to a second GPI-anchored receptor, either aminopeptidase-N (APN) or alkaline phosphatase (ALP) depending on the lepidopteran insect species, leading finally to insertion of the toxin into membrane lipid rafts (Bravo et al., 2004). This binding leads midgut epithelial cells disruption and eventually insect death (Vachon et al. 2012). It seems that a clear understanding of the effect of Bt toxins is necessary to increase the efficacy of Bt toxins against insect pests. Therefore, in the fifth part of the dissertation, with respect to the unique properties of the identified cryII gene, the mode of action of CryIIa toxin was studied.

In addition to insecticidal activity, Bt δ -endotoxin has antimicrobial activity against some pathogenic bacteria, such as *Erwinia* and *Pseudomonas* (Yudina and Burtseva 1997). Finding a specific, easily degradable and low cost Bt-based formulation as an alternative to chemical pesticides, for controlling both insect pests and plant diseases, would be highly valuable in biological control. There are evidences of an antibiotic action of spores and crystals of Bt strains on phytopathogenic fungi and bacteria. In this study the antimicrobial activity of the seven previously characterized Bt strains was assessed against plant pathogens such as the fungus *F. oxysporum* or the bacteria *Erwinia* sp.. Further, chitinase gene, as an important antifungal agent, was traced in the studied Bt strains.

It has been demonstrated that Bt strains have potential to promote plant growth, to improve nutrient uptake and to protect plants under abiotic and biotic stress conditions. Different Bt strains can protect the plants from phytopathogens through siderophores production, chitinase activity, increasing the activities of plant resistance enzymes and induction of systemic resistance (Dimpka et al., 2009; Compant et al., 2009). On the other hand, based on the interaction between plant and Bt strains, the experimental evidence

shows that this bacterium has the ability to transfer and move vertically in the plant, colonize and present actively in the vegetative stage inside the plant (Bizzarri and Bishop 2007, 2008; Maduell et al., 2007; Vidal-Quist et al., 2013; García-Suárez et al., 2017). Although pesticides based on Bt have been widely used for years, little is known about the interaction between plant cells and Bt strains. The aim of this part of the thesis was to study plant-Bt interaction at the cellular level, by focussing on the effect of Bt inoculation on plant anti-oxidant status. As a result, the seventh section of this thesis focuses on the metabolic and biochemical effects of Iranian strains of Bt on tomato plant cells.

Generally, with the above considerations, these are the clear objectives of this thesis:

- Determination of insecticidal and molecular characteristics of isolates of Bt
- Expression, purification and activation of Cry1Ia proteins
- Assessment of insecticidal and cytotoxic activity of Cry1Ia toxins
- Determine the oligomer formation of Cry1Ia toxin
- Estimation of antimicrobial activity of Bt strains
- Determination of physiological and biochemical effects of Bt strains on plant cells

1.2. *BACILLUS THURINGIENSIS*

Bacillus thuringiensis (Bt), spore forming, gram-positive, aerobic or anaerobic bacterium, produces crystal proteins during the stationary phase of its growth cycle. This species of the Bacillaceae family, in the class of bacteria those their growth does not depend on light (Scotobacteria), is a phylum of the bacteria with a thick layer of peptidoglycans in cell membrane (Firmicutes) and Prokaryotes kingdom. In addition, this species is present in a group of *Bacillus* species producing endospores, and this endospore does not cause swelling of the rod-shaped bacterial cell (Fig. 1-1). The strains of this species often have lateral flagella, metabolism through both respiration and supernatant and the appropriate pH for growth of this bacterium is 7.5-8.

The bacterium (Bt) was isolated in 1901 by a Japanese biologist Ishiwata from the infected silkworm, and named as *B. sotto*. In 1911, Bt was isolated from *Ephestia kuehniella* (The Mediterranean flour moth or mill moth) infected larvae by Ernest Berliner in the Thuringia region of Germany and was called *B. thuringiensis*. For the first time in 1928, bacterial crystals of Bt were used to control the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hüber (Lepidoptera: Crambidae). The first commercial Bt-based product, Sporine, was produced in France in 1938 and was used to control flour moths. By characterization of more toxins from the Bt strains, a revolution has occurred in genetically modified *cry* gene products (Lambert and Peferoen, 1992). The synthesis of *cry* genes from Bt strains led to the introduction of transgenic plants that were resistant to pests (Letourneau et al., 2003). Since 1996, the cultivation of insect resistant plants known as Bt crops has expanded worldwide (Kleter et al., 2007).

Bt is widely dispersed in the environment as a spore-forming bacterium and can be easily isolated from soil, water, plants, insect feces, dust, and storage products (Federici et al., 2006). When the food is sufficient for the growth of the bacterium, the spores germinate and begin the growth stage and reproduce through duplicate reproduction. The bacterium continues to proliferate until food sources are sufficient to sustain vegetative growth. Under adverse conditions, the Bt strain produces spore and one or more insecticidal protein crystals during the sporulation phase (De Maagd et al., 2003). Bt is a member of the group *B. cereus* sensu lato, which in addition to Bt includes five different species of

basil; *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* and *B. weihenstephanensi*. Crystals are the main attributes of differentiation of Bt strains from other related species (Xu et al., 2014).

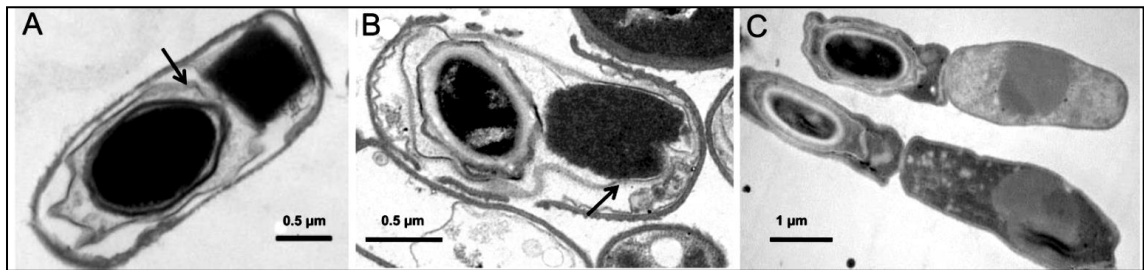


Fig. 1. 1. Different crystal morphology in Bt strains. A; Bt HD73. B; Bt YBT-020 and C; Bt LM1212 (Deng et al., 2014).

1.2. NOMENCLATURE, DISCOVERING AND CLASSIFICATION OF Bt TOXINS

In the early 1980s, immediately after the development of the recombinant DNA production technique, researchers found that Bt δ -endotoxin genes were located on bacterial plasmids. This finding was the starting point for genetic studies and molecular biology of Bt toxins. These genetic studies led to the cloning and sequencing of a number of Bt δ -endotoxin genes. As a result, due to the urgent need for a naming system for the organization of newly discovered genes, numerous and confusing names have referred to proteins and δ -endotoxin genes (Adang et al. 2014). In 1989, Hofte and Whitely proposed a new nomenclature method for the protein and Bt genes based on the range of activity of these proteins. In this nomenclature system, proteins are called Cry (for crystalline proteins) and Cyt (for cytolytic proteins). In this naming system, Bt toxins were grouped with Roman numerals according to their range of insecticidal activity. For example, CryI toxins were found toxic for the Lepidoptera, CryII for Lepidoptera and Diptera, CryIII for Coleoptera and CryIV were found specifically for toxic for Diptera. One of the problems with this nomenclature system was to name a new toxin. Because firstly it was

necessary to perform bioassay experiments using new toxins against all insects that were previously detected as susceptible to other toxins (Palma et al., 2014). To avoid these problems, the Bt nomenclature committee proposed a new naming system in 1998. In this system, Bt toxins are named based on the similarity of the sequence of amino acids. In this naming system, the name of a toxin is composed of four levels; for example: Cry41Ab1 toxin, numbers are used to specify the first and fourth levels. Uppercase and lowercase letters are used respectively to interpret the second and third levels. In this way, proteins that are less than 45% similar in amino acid sequence have a new number (for example, Cry1 and Cry2). Proteins that have less than 78 percent similarity to other described proteins, will receive new letters in the second level (uppercase letters) (for example, Cry1A and Cry1B). Proteins that are similar other proteins less than 95% are different in the third level (lowercase letters) (for example, Cry1Aa and Cry1Ab) and, finally, to differentiate proteins that are more than 95% similar, the fourth level (Cry1Aa1 and Cry1Aa2) will be changed (Palma et al., 2014).

The insecticidal activity of Bt strains depends on the crystal protein that this bacterium produces during the sporulation phase. Crystals are the main attributes of the differentiation of Bt from other species associated with *Bacillus cereus* and even the rest of the bacilli. These crystalline inclusions contain one or more proteins, most of which are highly toxic to one or more insect species. These proteins, called toxins or δ -endotoxins, are generally found in the Cry toxin group (for crystalline proteins) and Cyt toxins (for cytolytic proteins).

As already mentioned, Bt strains produce proteins that are toxic to many insects, mites, nematodes, protozoa and human cancer cells. These proteins can be accumulated in parasporal crystalline inclusion during the stationary growth phase of bacterial life cycle, such as Cry, Cyt, and Parasporin proteins, or they can be secreted during the vegetative phase of the bacterial growth, such as Cry1I, Vip and Sip proteins (Van Frankenhuyzen 2009; Ohba et al., 2009; Palma et al., 2014; Chakroun et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018). Further, the definition of each Bt toxin is discussed.

1.2.1. CRY TOXINS

Parasporal crystals of Bt strains are composed of crystalline proteins, which are called crystalline toxins or δ -endotoxins, and are generally found in two groups of Cry and Cyt toxins. Cry toxins are toxic for the most insects, some of them have a very broad host range and show different degrees of pathogenicity. To date, the Bt toxin nomenclature committee has introduced about 75 groups of Cry toxins with different initial descriptive levels (from Cry1 to Cry75), which are toxic against Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, nematodes, parasites of humans and animals and human cancer cells (<http://www.btnomenclature.info>). Cry toxins, despite differences in the sequence of amino acids and protoxin, have a three-domain structure. Presence of one to five conserved block in the amino acid sequences of Bt Cry toxins is the dominant feature of Cry three domain toxins (Pardo-Lopez et al., 2013). The three-dimensional structure of the Cry2Aa toxin is shown in the figure below. Latin numbers in Figure 1-2 represent the Cry2Aa protein domains; the domain I: pore forming domain, the domain II; or the central domain, involved in receptor-toxin interactions, the domain III; responsible for binding the toxin to the receptor and pore formation (Palma et al., 2014).

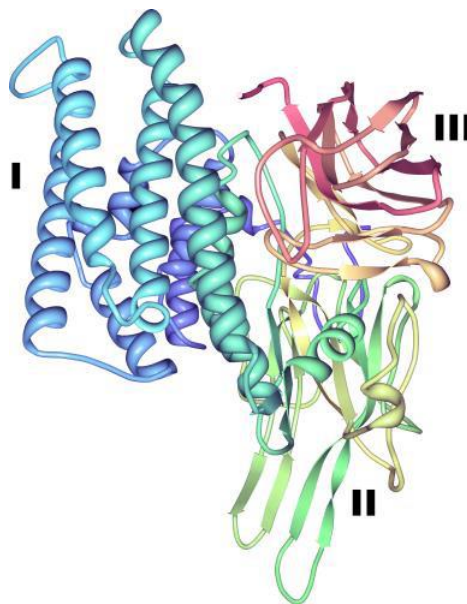


Fig. 1. 2. Three-dimensional structure of Cry2Aa toxin (Palma et al., 2014).

The domain I or perforating domain, located at the N-terminal of the protein consists of seven α -helix cluster that is subjected to proteolytic cleavage in all three-domain Cry proteins during toxin activation and this may be responsible for toxin membrane insertion and pore formation. In which the Alpha Five hydrophilic helix is surrounded by six amphipathic helix. The domain II or central (middle) domain consists of three anti-parallel β sheets and plays an important role in the interactions between toxin and receptor, toxin oligomerization and membrane insertion. Finally, domain III is a β sandwich that consists of two anti-parallel β sheets and is important in receptor binding and the formation of pores (Xu et al., 2014).

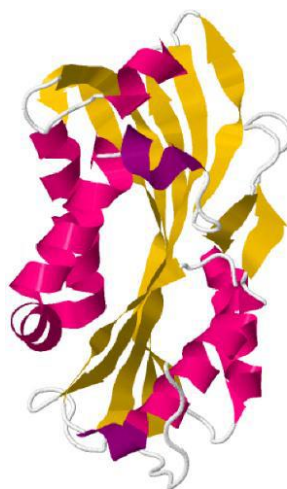
Cry and Cyt toxins belong to a group of bacterial toxins that are known as pore-forming toxin. These toxins are water-soluble proteins that undergo structural changes to binding and transfer in the membrane of their host cells (Bravo et al., 2007). There are two major groups of pore-forming toxin: 1. Toxins with the alpha chain, which create alpha helix regions in the host cell membrane, and 2. B toxins, through the structures of the β sheets are attached to the host cell membrane (Parker and Feil 2005). The first group of toxins which forms pores, including colicin, exotoxin A, diphtheria toxin, and also three domain toxins. While aerolysins, alpha-hemolysin, cholesterol-dependent toxins, and also Cyt-toxins, belong to the second group of toxins (Parker and Feil 2005). But in general, pore-forming toxins are associated with specific receptors on the surface of the host cells.

1.2.2. CYT TOXINS

Cyt toxins were initially found in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Adang et al., 2014). Cyt toxins in terms of the amino acid sequence are very similar to Cry toxins and are commonly toxic to Diptera. Cyt toxins are referred to as toxins that have a hemolytic effect. Also, Cyt toxins have the property of eliminating erythrocytes (red blood cells) in vertebrates and in the invertebrate (Mizuki et al., 1999). The group of toxins genetically divides into three main groups of Cyt1, Cyt2 and Cyt3, which were formerly CytA, CytB and CytC, respectively (Schnepf et al., 1998). Figure 1-3 shows that Cyt toxins are composed of a single-domain with three layers of alpha- β proteins (Palma et al., 2014).

Cyt toxins, like Cry, are produced as protoxins and after activation, small portions of the amine and carboxylic ends are cleaved (Li et al., 1996). Cyt toxins with a molecular weight of 28 kDa play a synergistic role for some Cry toxins (Adang et al., 2014).

Cyt toxins are generally toxic for mosquitoes and flies. But recent studies have shown that some subspecies of Bt, for example *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* has cyt genes, which for a wide range of insects include Diptera, Lepidoptera, and Coleoptera (Guerchicoff et al., 2001). Cyt1A and Cyt2A protoxins are ingested by the host insect then cleaved by the digestive protease enzymes at the carboxylic and amine end of the protein and converted to the resistant core of 25 and 23 kDa, respectively. Activated Cyt toxin has a strong tendency to attach to the lipids of the membrane of midgut epithelial cells of the host. Based on the model presented by López-Díaz et al. (2013), the binding of Cyt-activated toxin to membrane lipids leads to changes in the structure of toxin, the formation of oligomeric structures, pore formation, and ultimately death of the cell.



Cyt1Aa

Fig. 1. 3. Three-dimensional structure of Cyt1Aa toxin (Palma et al., 2014).

1.2.3. PARASPORIN TOXINS

For several years, Bt has been believed to have obtained its insecticidal activity in relation to the evolution of the insects through a host-parasitic relationship. This hypothesis has been appealing to many researchers, but based on the evidence, a new hypothesis has

emerged that the Bt bacterium, as a species, is principally an environment saprophyte, not an insect pathogen. This hypothesis is supported by a significant increasing number of natural Bt isolates without insecticidal properties compared to insecticidal isolates. In other words, more than 90% of Bt isolates, which are isolated from the soil or from the surface of the foliage and leaves of plants, do not have insecticidal activities. So, the question is that: do these strains that do not have insecticidal properties have any other biological activity that remains unknown? It is clear that these proteins have biological activity, but this activity has not yet been known. Nematicidal and antimicrobial activity of the crystalline inclusion bodies of some Bt strains that can not kill insects has been proven (Yudina and Burtseva 1997). For the first time in 1999, Mizuki and co-workers reported a unique activity of Bt toxins. Thus, non-insecticidal proteins of some Bt strains have the ability to eliminate human cancer cells. The newly discovered proteins are both different in terms of toxicity and activity levels. These proteins are called Parasporin because of the differences in cancer cells and healthy cells that can detect cancer cells and only kill the cancer cells. Parasporins are isolated from Bt strains that have no insecticidal activities. Initially, parasporin was identified as Cry protein, but significant cytotoxic activity and an increase in the number of members of this group made parasporins unique. The committee for the classification and nomenclature of these proteins was formed in 2006, which attributed the name Parasporin to a group of Bt proteins that do not have the ability to kill insects and tend to kill cancer cells. (Adang et al., 2014).

1.2.4. SECRETED TOXINS

In addition to the Cry and Cyt toxins produced during the sporulation phase of the bacterial growth cycle, another group of Bt toxins is released into the bacterial culture during the vegetative stage. These insecticidal secreted proteins are divided into two general groups: vegetative insecticidal proteins (Vip) and secreted insecticidal proteins (Sip). The nomenclature system for Vip and Sip toxins is similar to that of Cry and Cyt toxins. Up to now, four main groups of Vip toxins, from Vip1 to Vip4, and a Sip toxin group have been reported (Crickmore et al. 2014)

The position of the *vip* genes has not yet been identified, but it seems to be on the same plasmids that code the *cry* genes. The first known vegetative secreted protein, Vip1 and Vip2, were weighted 100 and 52 kDa in size, and were very toxic for some Coleopteran insect pests (Hernandez-Rodriguez et al., 2009). The other group, Vip3, is toxic to the Lepidoptera and produces proteins with a molecular weight of 88.5 kDa. The mode of action of Vip proteins is similar to that of the δ -endotoxin and consists of separate stages. The symptoms of host infection to vegetative insecticidal proteins, such as those caused by crystalline proteins, except that the signs of contamination caused by ingestion of crystals occur 16 to 24 hours after feeding. While in the case of vegetative proteins, symptoms appear at 48 to 72 hours after feeding the larvae. The range of insecticidal activity of Vip proteins is vast and includes important agricultural pests that are less susceptible to δ -endotoxin. For example, the toxicity of vegetative proteins against *Agrotis ipsilon* is 260 times more than that of Cry1A proteins. Unlike Cry toxins, vegetative insecticidal proteins do not form crystalline inclusions, they are secreted from the same primary cells into the medium (Lee et al., 2003).

The group of secreted insecticidal proteins has only one member, Sip1Aa1, which is toxic for larvae of Coleopteran pests. The Sip protein was first isolated from the Bt EG2158 strain medium. The sip1Aa1 gene has 1104 base pair that codes a protein of 367 amino acids and a molecular weight of 41 kDa (Palma et al., 2014).

1.2.5. OTHER VIRULENCE FACTORS OF BT STRAINS

Different Bt strains besides Cry proteins, also produces other factors with insecticidal activity such as thuringicin, zwitteramycin, Mtx toxins, and bin-like toxins, as well as antimicrobial enzymes.

- β -exotoxin

The β -exotoxin, called Thuringiensin (Thu), is a heat-resistant secondary metabolite of Bt. β -exotoxin has insecticidal activity against wide range of insects in the Diptera, Coleoptera and Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera and Hemenoptera orders species,

and even some species of nematodes. Unlike insecticidal crystalline proteins, Thu is composed of adenosine, glucose, phosphoric acid and gluconic dylacid with the chemical formula $C_{22}H_{32}O_{19}N_5P$, not a protein, but a small oligosaccharide molecule that contains adenosine, glucose, Phosphoric acid and gluconic dioxide with a ratio of 1:1:1:1. The molecular weight of Thu is 701 kDa.

β -exotoxin is resistant to heat and is expressed during vegetative growth phase and is secreted into the culture medium. β -exotoxin was firstly identified by McConnell and Richards in 1959; they injected autoclaved supernatant of Bt culture into several species of insects and eventually this injection killed the insects. The insecticidal mechanism of Thu is not well defined. However, we know that Thu is an analogue of adenosine triphosphate (ATP), which interferes with the activity of the RNA polymerase. In fact, Thu inhibits RNA synthesis by competing with ATP to attach to the bonding site. The symptoms of Thu caused in insects are different from the symptoms of Cry toxins.

Thu toxicity for mammals has long been the subject of debate, and several studies have shown that Thu is toxic for mammals. As a result, according to the World Health Organization (WHO), the general use of Thu has been banned (Liu et al., 2014).

- Acyl Homoserine Lactone (AHL) lactonase

Many of the important bacterial pathogens such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora*, *Pantoea stewartii* and *Pseudomonas aeruginosa* for quorum sensing use Acyl Homoserine Lactone (AHL) lactonase as a signal molecule. This system allows the pathogen to regulate the expression of toxic factors in order to effectively attack their host. The AHL lactonase enzyme is a 250 amino acids protein with a zinc-binding motif that is protected among various groups of metallo hydrolase enzymes (Dong et al., 2001). The AHL lactonase gene has been detected in more than 500 Bt strains, and the results indicate that the gene encoding enzyme is widely found in the Bt genome. The exact role of AHL lactonase in Bt and the reason for the presence of AHL lactonase gene in *B. cereus* bacteria is not yet known (Zhou et al., 2008). Some studies have highlighted the role of AHL lactonase as an enhancer of the competition power of *Bacillus* species in the soil (Vinoj et al., 2014). In

justifying the presence of AHL lactonase gene, the hypothesis of competition is raised. In this way, Bt strains with insecticidal activity through self-induced-degenerative activity cause the elimination of other gram-positive bacteria that exist in natural ecosystems with them (Lee et al., 2002). Of course, this hypothesis contrasts with the effect of Bt on gram-negative bacteria, including *E. carotovora*. On the other hand, many strains lacking this gene are able to survive in the same ecosystems. Finally, all of these findings indicate that AHL lactonase has a self-regulating function that changes some of the behaviors of Bt strains in a way that is beneficial for themselves (Zhou et al., 2008).

- Zwittermicin A

Zwittermicin is an antibiotic that has a very wide range of activities. This antibiotic has a high activity against humans and moderate activity against some gram-negative bacteria and many pathogenic fungi, such as *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Ustilago* (Silo-Suh et al., 1994). Many strains of *Bacillus* that produce Zwittermicin inhibit the growth of *E. herbicola* bacteria. Zwittermicin A has a strong inhibitory effect on germination of cysts and growth of the germ tube. In addition to the wide range of antibiotic activity of Zwittermicin, it has also been proven that there is a synergistic relationship between Zwittermicin and Bt toxins (Broderick et al., 2003).

- Bacteriocin

Bacteriocins are natural, small, and heat resistant antimicrobial peptides that are synthesized and secreted by bacteria. Bacteriocins, through competition in the use of available food, have the ability to control or eliminate bacterial species close to themselves. Bacteriocins are small peptides with a molecular weight of 3 to 12 kDa, which are produced during the stationary phase of Bt growth. Bacteriocin produced by a Mexican Bt strain showed antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria; *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* (Fuente-Salcido et al., 2008).

- Chitinase

Chitin is a long polymer of β -1 and 4-n-acetylglucosamine monomers, which is found in the external skeletal cell wall of fungi and algae. Bacteria do not have the ability to synthesize chitin, but some bacterial species secrete chitin degrading enzymes, and the ability to hydrolyze this polymer and liberate acetyl glucosamine units for use as a carbon source or nitrogen (Bhattacharya, 2007). Chitinase enzyme is one of the most important antifungal agents known in different Bt strains. Bt strains that are capable of producing chitinase enzyme, have a high anti-fungal activity against *Fusarium roseum* var. *sambucinum* (causative agent of dry rot in potato tubers), *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Urocystis tritici*, *F. verticillioides* and *B. cinerea* (Salehi Jouzani et al., 2017).

- Enhancin-like proteins

Enhancin proteins in Bt strains are 20 to 30 percent similar to viral Enhacins. The viral enhacins increase the pathogenicity of viruses through eliminating the mucin of peritrophic membrane in the gut of insects. One of the known enhacins in Bt, is Bel enhancin, that can increase the toxicity of toxin in oral administration with Cry1Ac toxin to *Helicoverpa armigera* larvae (Fang et al., 2009).

1.3. CRY TOXINS MODE OF ACTION

The current model of Cry toxin mode of action in the insect midgut is given in Fig. 1.4. As it is shown in the figure, after ingestion of Bt crystals by susceptible larvae, toxin crystals are solubilized in the midgut fluids to yield the Cry protoxin form, which is processed to an activated Cry toxin form equivalent to the Cry toxin ingested by insects feeding on transgenic Bt crops. The Cry toxin core then traverses the peritrophic matrix, which is able to retain some of the toxin (darker toxin molecules in the figure). Once reaching the brush border membrane of the midgut epithelium, the Cry toxin binds with high affinity to cadherin, which results in activation of intracellular cell death pathways

(represented by G protein, adenylate cyclase and cAMP in the figure), and/or according to the ‘sequential binding’ model, further proteolysis of the toxin monomer to result in formation of a pre-pore oligomer. This pre-pore oligomer is proposed to bind to alkaline phosphatase (ALP) or aminopeptidase (APN) to insert in the membrane forming a pore that leads to osmotic cell death. The insertion of toxin monomer and formation of a pore by oligomerization of inserted monomers is also presented as an alternative step. Disruption of the midgut epithelium barrier allows for bacterial invasion of the haemocoel, leading to septicemia and death of the insect.

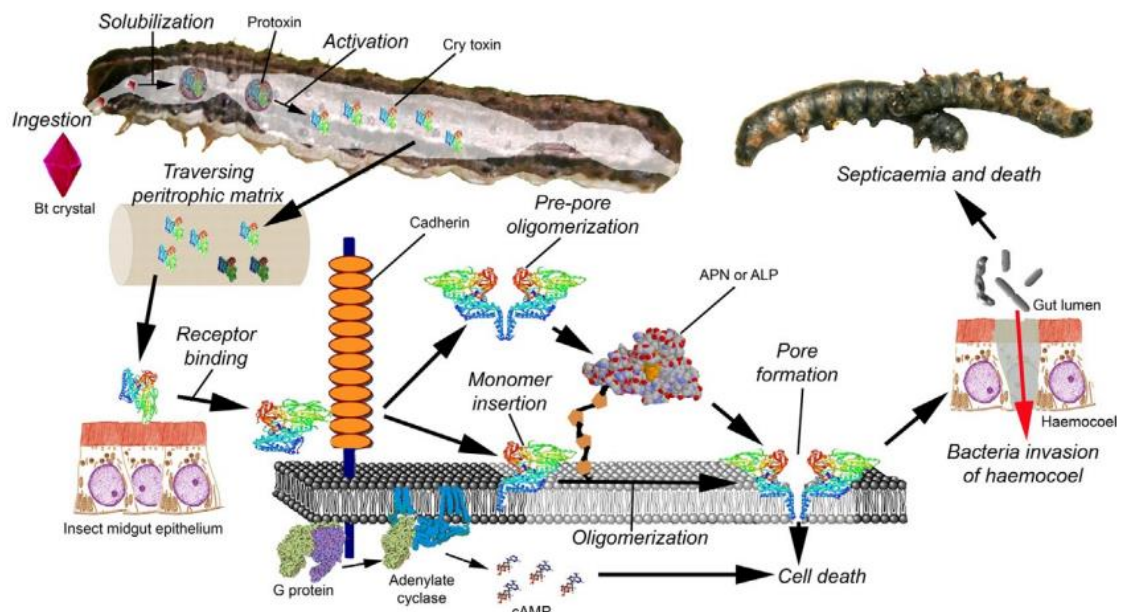


Fig. 1. 4. Representation of the current models of Cry toxin action in the insect midgut epithelium (Adang et al., 2014).

Different models have been proposed for the mode of action of Cry toxins, in which there is a more consistent evidences for the sequential binding model (Figure 1.5). The sequential binding model for Cry1A toxin and its receptors has been investigated (Bravo et al., 2004). The results showed that in the sequential binding model (fig 1.5) the primary and reversible binding of Cry1A activated toxin to the primary receptor, the extracellular part of the cadherin, leads to changes in the structure of the toxin. Cadherin, a polyp peptide with a size of 720 to 750 amino acids, is composed of three domains. Cadherins are transmembrane proteins with a cytoplasmic domain and an extracellular ectodomain with several cadherin repeats, 12 in the case of Bt-R1 (Vadlamudi et al., 1995). The

ectodomain contains calcium-binding sites, integrin interaction sequences and cadherin binding sequences.

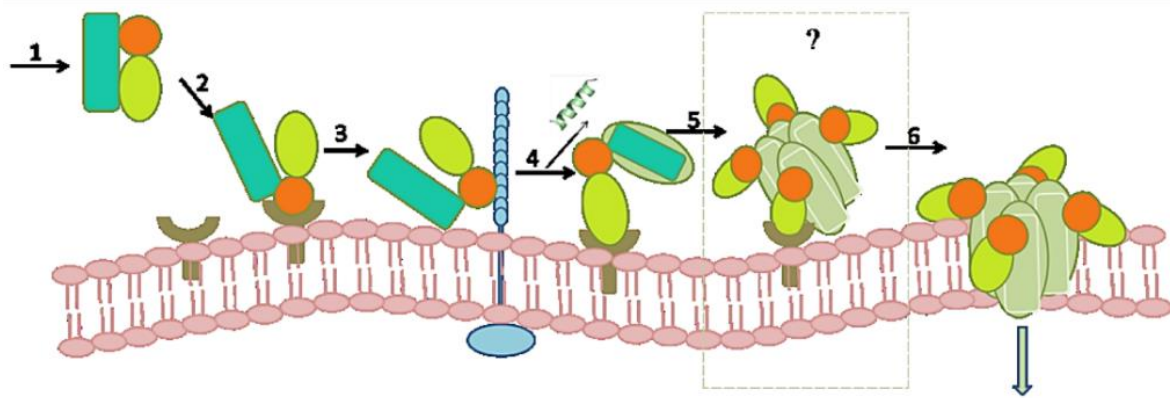


Fig. 1. 5. Sequential model of Cry toxins mode of action. Cry toxins interact with different receptor molecules in lepidopteran larva. 1. Solubilization of the ingested crystals due to alkaline environment of insect midgut and activation of protoxins by midgut proteases; 2. Binding the toxins to receptors GPI, aminopeptidase and alkaline phosphatase; 3. Binding of monomeric Cry toxin to the first receptor (cadherin or 270 kDa glycol-conjugate receptor); 4. Conformational changes is induced in the toxin and α -helix 1 is cleaved; Binding of oligomeric toxin to second receptor (glycosylphosphatidyl-inositol-APN or glycosylphosphatidyl-inositol-ALP); 5. Oligomer formation; 6. Insertion of the oligomeric toxin into lipid rafts, pore formation and cell death (Xu et al., 2014).

Due to the binding of Cry toxins to the cadherin receptors, another proteolytic cleavage at the N-terminal of the alpha 1 of the domain I occurs. This cleavage induces the formation of oligomeric toxins. These 250 kDa oligomers are more likely to interfere with secondary receptors including glycosyl phosphatidyl-inositol, N-aminopeptidase and alkaline phosphatase. The binding of toxins to aminopeptidase and alkaline phosphatase receptors increases the concentration of toxin oligomers in the membrane of the midgut epithelial cells. Subsequently, oligomeric structures bound to secondary receptors

penetrate into the midgut epithelial cells and, through pore formation and opening of ion canals, cause cell death due to osmotic shock (Bravo et al., 2007).

For Cry1A, at least four different proteins in the midgut of the insect have been identified (Figure 1-6); cadherin, aminopeptidase, alkaline phosphatase and a receiver connected to a 270 kDa glycol (Bravo et al., 2007).

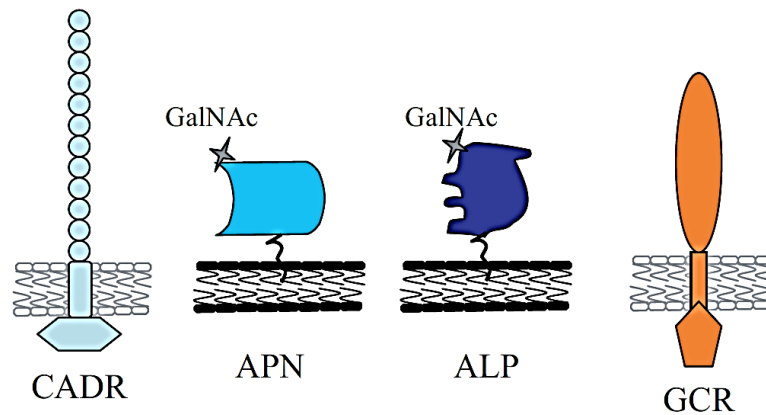


Fig. 1. 6. Receptors molecules of Cry1A proteins. CADR: cadherin receptor; APN, aminopeptidase-N, ALP, alkaline phosphatase, GCR, 270 kDa glycol-conjugate receptor (Bravo et al., 2007).

1.4. THE ROLE OF Bt IN CONTROLLING PLANT DISEASES

Formerly, only the insecticidal properties of *B. thuringiensis* attracted extensive attention. However, in recent years, the roles of Bt in plant disease control have been found out. Preparing a formulation based on Bt, that is able to suppress insect pests and plant disease simultaneously, is a powerful alternative to synthetic chemicals (Mohammad et al., 2013). In addition to the insecticidal action of delta-endotoxins, some are active against some bacteria (Kamenek et al., 2012). There is also evidence of an antibiotic action of spore and Bt complex on phytopathogenic fungi (Grishechkina et al., 2002). It has been demonstrated that delta-endotoxin has antibacterial effect on *Erwinia* and *Pseudomonas* and antifungal activity against *Fusarium*, *Bipolaris*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Alternaria*, and *Rhizoctonia* (Kameneck et al., 2012; Zheng et al., 2013; Shrestha et al., 2015). Apart from crystal protein and other insecticidal

substances, Bt also produces other active components with good prospects of application as following: zwittermicin A, which is extremely efficient at preventing the damping-off of alfalfa caused by *Phytophthora medicaginis* (Silo-Suh et al. 1994), acyl homoserine lactone (AHL) lactonases, which can quench bacterial pathogenicity (Dong et al. 2002), chitinase, an important antifungal agent, fengycin a lipopeptide with potent ability to control phytopathogenic fungus, and bacteriocin as a preservative and natural antimicrobial peptide (Fuente-Salcido et al., 2008). These findings widen the target range of Bt besides insecticidal activity and help people to better understand its role in soil ecosystem.

1.5. EFFECT OF Bt ON PLANT CELLS

The results of the previous studies point to the role of Bt in stimulating plant growth through the production of plant hormones, such as auxins, or by acting on the balance of plant ethylene, increasing mineral nutrition. The biocontrol activity of Bt strains is accomplished owing to the production of bacteriocins, autolysins, lactonases, siderophores, β -1,3-glucanase, chitinases, antibiotics and hydrogen cyanide. Moreover, there are several researches about the roles of Bt strain regarding to the protection of plant against abiotic stresses, antimicrobial activity against fungi and bacterial phytopathogens, siderophore production, chitinase production and induction of systemic resistance in plants (Raddadi et al., 2008; Goes et al., 2012).

On the other hand, regarding to the interaction of plant and Bt, experimental evidences show that the bacterium has the ability to transfer and move vertically in the plant, colonize and present it in the form of active (metabolically active) in the plants (Bizzarri and Bishop 2007, 2008; Maduell et al., 2008; Parca et al., 2012; Vidal-Quist et al., 2013; García-Suárez et al., 2017).

Some species of *Bacillus* genus, with endophytic properties, have several benefits to the plant, including protection of plants against phytopathogens, insects and nematodes, induction of systemic resistance and stimulation of plant growth without causing any damage to the environment. Some species of *Bacillus* genus namely; *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. pumilus* and *B. licheniformis*

are among the most widely used species of *Bacillus* species in agriculture (Lopes et al., 2018).

The most important role of the mentioned bacteria is to protect the plant against an attack by plant pathogens. Because during the pathogen invasions to the plant, various reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anions ($O_2\bullet^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($OH\bullet$) are produced. These reactive oxygen species are produced by cytoplasmic enzymes, enzymes bound to the membrane or extracellular enzymes that are involved in reduction reactions (Greene et al., 2002). To prevent possible damage of these reactive oxygen species, plant cells have several anti-oxidant enzymes and non-enzymatic parameters that make reactive oxygen non-toxic. Under stress conditions, the formation and elimination of reactive oxygenates becomes equilibrium. However, some biotic and abiotic stresses such as pathogens, increased light energy, drought and low temperatures increase the production of reactive oxygen species, which leads to cell damage and inactivity of enzymes. Finally, if the concentration of reactive oxygen is increased, cell death occurs as the system does not have the ability to detoxify the ROS. Several enzymes have been found to be involved in the metabolism of reactive oxygen species, following a pathologic attack on plants. Meanwhile, superoxide dismutase enzymes (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), guaiac peroxidase (GPX; EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) are of particular importance. These enzymes prevent the loss of plant cell integrity due to reactive oxygen species during plant-pathogenic interactions (Bolwell et al., 2002; Mittler 2002). The excessive production of reactive oxygenates during oxidative reactions is part of the response of plant cells to pathogens. The relationship between the formation of reactive oxygen species and the increased activity of the enzymes involved in their metabolism, under the influence of host plant defense responses to the attack of pathogens, is found in many plants and reviewed elsewhere (Wojtaszek 1997).

CHAPTER TWO

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *B.* *tHURINGIENSIS* STRAINS

2.1. INTRODUCTION

The purpose of Bt isolation from diverse biological sources is to find isolates that have a greater or newer activity. Consequently, after discovery of Bt bacteria, the characteristics of the isolates must be determined. The new isolates of Bt should be described, categorized and ultimately the insecticidal activity, cytotoxic activity, nematocidal activity or potential antimicrobial activity have to be investigated. Different methods have been used to determine the characterization of Bt isolates, including; biochemical experiments, serotyping (based on flagella antigens), determination of gene content, sequencing of the entire genome, protein profiles analysis, determination of the composition and type of proteins in the parasporal crystalline inclusion bodies, bioassay experiments, investigation of cytotoxic activity, antimicrobial activity, and the effect of Bt strains on growth and physiological features of plants.

Different Bt strains have the ability to live in diverse biological environments. The Bt isolates are obtained from different habitats such as soil, dead and infected insects, dust, stored products and plant leaves. So far, many studies around the world have been focused on the isolation of Bt strains from a wide variety of biological sources (Bel et al., 1997; Bravo et al., 1998; Uribe et al., 2003; Hernández et al., 2005; Arrieta and Espinoza 2005; Thammasittirong and Attathom 2008; Vida-Quist et al., 2009; Alper et al., 2014; Djenane et al., 2017).

In Iran, a few studies have been focused on isolation of Bt strains from different environmental sources and characterization of Bt strains based on Bt gene diversity, the identification of specific and active genes for lepidopteran, coleopteran and dipteran insect pests as well as nematocidal activity (Salehi Jouzani et al., 2008a; Salehi Jouzani 2008b; Seifinejad et al., 2008; Nazarian et al., 2009). During the years 1380-1378, 2234 soil samples from all Iranian provinces were collected and 128 Bt isolates were isolated (Marzban, 2005). In 2008, the Agriculture Department in Iran collected 514 samples of dead and infected insects as well as soils from 8 provinces of Iran, and obtained 127 isolates of Bt. Armamideh (2010) also collected 48 native Bt isolates from biological environments such as soil, dead and diseased insect, plant remnants, current water and dust and food storage warehouses in West Azerbaijan province.

In a study performed by Mizuki et al. (2000), a gene with 2169 bp length was found, consisting of 723 amino acids, with a molecular weight of 81052 Daltons. This gene, like all other Cry proteins, encoded a protein that consisted of five conserved blocks. This novel gene showed a very low similarity (less than 25%) to other known Cry proteins characterized so far. The effect of this new protein has been determined on several cell lines. The used human cell lines were as follows: leukemic T cells, HeLa cells (cancer cells of the uterus), lung cancer cells and healthy and normal lung cells. In the mentioned research, two insect cell lines including silkworm cells (*Bombyx mori*) and mosquito cells (*Aedes albopictus*) were also used. The results showed that, when this protein was hydrolyzed by proteases and converted to molecular weights of 40 and 60 kDa, they exhibited cytotoxic activity. The trypsin-activated Parasporin protein is only toxic for uterus and blood cancer cells and has no effect on healthy cells and insect cells.

Comparison of protein band patterns obtained by SDS-PAGE, evaluation of gene content (screening of *cry1*, *cry3*, *cry7*, and *cry8* genes) and studying the insecticidal potential on *Spodoptera frugiperda* and *Premnotrypes vorax*, were used as criterion for characterization of 108 Bt isolates from Colombia (Uribe et al., 2003). The results showed that *cry1* gene was the most frequent among the studied genes, and some of the studied strains showed high toxicity on the target pests.

With the aim of finding new strains, Bt isolates from soil, dust, dead insects, spider and mites from different regions of Argentina were isolated. The characteristics of the obtained were described based on the crystal protein profiles and gene contents focusing on the *cry1* and *cry3* genes. The insecticidal activity of the obtained isolates was tested towards the lepidopteran pests *S. exigua* and *Anticarsia gemmatilis*, and 41 Bt strains with insecticidal properties against these pests were introduced (Berón and Salerno 2006).

The characterizations of 70 Bt strains isolated from soil, dead insects and leaves of plants from different climate zones in Iran were determined by different methods. One of the used methods to describe the indigenous Bt isolates of Iran could be to study the gene content using polymerase chain reaction methods (by employing 25 specific and general primers for the *cry1*, *cry2*, *cry9* and *vip3Aa* genes), crystal morphology, plasmid profiles, SDS-PAGE protein band patterns and insecticidal activity on larvae of *Helicoverpa armigera* (Seifinejad et al., 2008). The *vip3Aa* gene was the most frequent amongst the

Bt strains. Based on molecular studies and morphology of the native Bt strains, the insecticidal activity of 20 Bt strains was tested against *H. armigera* larvae. The results showed that four Bt strains were toxic more than *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* for *H. armigera* larvae. But, interestingly these four strains, from the point of view of the protein profile and the *cry* gene content, have similarities to the *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* (Seifinejad et al., 2008). A variety of *cry* and *cyt* specific genes were studied in 128 Bt isolates from different parts of Iran. The morphological characteristics, protein profiles and genomic content of the isolates were studied. A total of 38 *cry* gene profiles were identified and some of these genes had not been previously described. Due to morphological characteristics, protein profiles and genetic content, the described Bt strains could be considered as suitable candidates for controlling Lepidopteran insect pests (Salehi jouzani et al., 2008a).

The characterization of the novel Bt strain namely, Bt M15 was performed based on the *cry* genes content, the cloning of identified genes and the determination of the range of insecticidal activity of the analyzed proteins. The M15 strain was isolated from the *Tetranychus urticae*. It produced crystalline inclusion with spherical shape. Based on the results of gel electrophoresis, this Bt strain contained at least two main proteins of 86 and 79 kDa. Following the cloning of the *cry* genes, the *cry31Aa2* was discovered and named based on the similarity in the sequence of amino acids with other Cry proteins. An interesting point was that, unlike the primary isolation of this bacterium from ticks, the M15 strain is not a pathogen for them, and even though does not produces beta-exotoxin, the results of using this toxin on mammalian cells indicates that Cry31Aa2 is toxic to some human cancer cells but does not have any harmful effects on healthy cells when it is proteolysis by trypsin (Jung et al., 2007).

For the screening of Bt isolates, in the study performed by Antonino de Souza et al. (2009), the insecticidal activity of the obtained Bt strains from soil samples was studied. The bioassay of 30 Bt isolates at a single concentration of 1×10^9 spores/ml, was investigated against the first instar larvae of *S. frugiperda*. Among the tested isolates, the I4A7 Bt strains were the most toxic for this target. The calculated LC₅₀ value for this strain was similar to that of *B. thuringiensis* var. *israelensis*, and significantly more than *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

In the study performed by Baig et al. (2010), 31 Bt isolates were described based on crystal morphology, biochemical tests, and *cry* gene profile. Using specific and general primers, the presence or the absence of *cry1*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry9* and *cry10* genes was investigated. The results showed that *cry1* gene was the most frequent among the studied strains.

Lenina et al. (2014) used the morphology of the bacterial colonies, the characteristics of crystals and the protein profiles as criteria for describing seven Bt strains. Also, these strains were studied in terms of gene content, focusing on *cry* and *ps* genes. The results of this study showed that 4 *ps* genes were present in two Bt strains. Then, in examining proteolytic activity, it was found that this Ps4 protein was not toxic to *S. litura* and *H. armigera*.

The shape of crystals, the gene content (*cry1*, *cry2*, *cry9* and *vip3*), antifungal and antibacterial activity of 157 Bt strains isolated from diverse sources in Algeria were evaluated by Djenane et al. (2017). Based on the results, most of the Bt isolates had antifungal activity and a few Bt strains showed antibacterial activity. In terms of the crystal morphology, a large variety of shapes was found: bipyramidal, irregular, triangular, cuboid and oval. In this study, *cry2* gene was the most frequent gene among the studied genes in the Bt strains.

Bioassay experiments provide comprehensive and complementary information on the insecticidal activity of the Bt strains or of the purified Bt toxins. The increasing number of articles related with toxicity of Bt strains or Bt toxins indicates the importance of bioassay experiments in determining the characteristics of the Bt strains. Many studies have focused on the relative toxicity of Bt toxins. Some variability can always be observed in the result of bioassays, these differences are due to the performance of way of performing the bioassay experiments, the type of used toxin (such as parasporal crystals, protoxins or activated toxin), the source of Bt toxin and Bt strain and also the susceptibility of the insect colony.

The insecticidal activity of seven purified Cry proteins, Cry1Ab, Cry1Ja, Cry1Fa, Cry1Ia7, Cry2Aa, Cry1Ab and Cry9Ca toxins, was tested against *Lobesia botrana*. Based

on the results, *L. botrana* larvae were highly susceptible to Cry9Ca toxin (Ruiz de Escudero et al., 2007).

Insecticidal activity of some Cry proteins such as Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry2Aa and Cry2Ab (active for the lepidopteran pests), was tested on three different *Spodoptera exigua* laboratory populations. Based on the results, Cry1Ca, Cry1Da and Cry1Fa toxins had the highest levels of toxicity against *S. exigua* first instar larvae (Hernández-Martínez et al., 2009).

The susceptibility of a population of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, to a formulation containing the reference Bt strain of Bt HD-1-S-2005, and its constituent toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry2Aa) was investigated. Based on the results, *O. nubilalis* larvae showed less susceptibility to Cry1Aa and Cry2Aa toxins. Most probably the presence of Cry1Ab and Cry1Ac proteins in the formulation was the reason of toxicity of the tested formulation to *O. nubilalis* larvae (Crava et al., 2009).

The mixture of spore and crystals of SY49.1 Bt strain was bioassayed on the Indian meal moth larvae, *Plodia interpunctella*. The results showed that the LC₅₀ value of the examined Bt strain was 2×10^6 spores/ml (Yilmaz et al., 2012).

The insecticidal activity of Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa, Vip3Af and Vip3Ca toxins (individually and also mixed together) has been evaluated against *Grapholita molesta* larvae. Based on the bioassay results, the most toxic proteins were Vip3Af and Cry1Aa (Scaramal Ricietto et al., 2016).

The insecticidal activity of MPUB9 Bt strain, alone and mixed with Vip3Aa proteins, was investigated on *S. exigua*, *Cydia pomonella* and *Dendrolimus pini* larvae. Based on the results, the crystals of the studied Bt strain were the most toxic component for *D. pini*. The use of a mixture of MPUB9 crystals with Vip3Aa toxins has a synergistic effect and increases the insecticidal activity of the strain (Baranek et al., 2017).

The susceptibility of resistant insect colonies from *Tricholusia ni*, *P. interpunctella*, *Helicoverpa armigera* and *O. furnacalis* species to Cry1, Cry2 and Dipel formulation were evaluated to Vip3Aa and Vip3Ca proteins. As expected, the resistant insect colonies to Cry1A and Cry2Ab showed no cross-resistance to Vip3 toxins. Also, Vip3Ca toxin

was highly toxic for *O. furnacalis* larvae, while Vip3Aa toxin had no growth inhibitory effect on these larvae (Gomis-Cebolla et al., 2018).

One of the molecular methods used for characterization of Bt strains, is SDS-PAGE analyses to show the differences in protein patterns of different isolates. With this methodology, different Bt strains are characterized and classified according to the number and the size of the protein bands observed in the gel, and eventually, their potential in insecticidal activity is predicted. This methodology has been used in some studies, along with other methods (studying the morphology of crystals, bioassays, determination the gene content) to set the characteristics of some Bt strains (Hernández et al., 2005; Rampersad et al., 2005; Seifinejad et al., 2008; Vidal-Quist et al., 2009; Hernández-Fernandez et al., 2011).

One of the common methods for determining the gene content of new Bt strains is to detect genes by polymerase chain reaction. Identification of the gene content using Polymerase Chain Reaction Methods (PCR) is a quick and accurate way to reproduce a specific DNA fragment, in order to determine the presence or absence of the target gene. Identification of Bt toxin genes with polymerase chain reaction can be used to predict the insecticidal activity of Bt strain (Porcar 2003). Identification of Bt *cry* genes based on the polymerase chain reaction was firstly performed by Carozzi et al., in 1991. They have described this method as a rapid means of prediction of the insecticidal activity of Bt strains. It has been published that PCR-based screening resulted in the identification of 22 distinct *cry* genes in 126 Bt isolates (Ben-Dov et al., 1997). Several researches have predicted the toxicity of Bt strains by focusing on the gene content of some specific genes (Uribe et al., 2003; Baig et al., 2010; Lenina et al., 2014; Djenane et al., 2017).

Another method for characterization of Bt strains is to evaluate the composition of proteins present in Bt crystals. Generally researchers use LC-MS/MS methods to determine the presence of Cry proteins. For instance, by using the combination of SDS-PAGE gel electrophoresis and LC-MS/MS proteomics analysis, the crystal protein composition of two *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strains have been determined (Li et al., 2012). The result of this study has shown that Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry2Aa protoxins are present in *B.*

thuringiensis subsp. *kurstaki* and Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, and Cyt2Ba protoxins are present in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Fu et al., 2008).

By combining polymerase chain reaction and proteomics-based methods, 4.0718 Bt strain was characterized in terms of gene content and composition of Cry proteins. The results showed that there are five different genes of *cry*; *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* and *cry1Ia* in the genome, and three protoxins, Cry1Aa, Cry1Ac and Cry2Aa, in the crystal inclusions (Sun et al. 2008).

The total protein content of 4.0718 Bt strain was studied in three stages of the bacterial growth: vegetative phase of growth, early sporulation and late sporulation phases, using proteomics MALDI-TOF/TOF MS. Based on the results, insecticidal crystalline proteins including Cry1Ac, Cry2Aa, and immune system inhibitors (InhA) were identified in the strain. Immune system inhibitors (InhA) were produced at the mid-stage of the vegetative stage of the Bt strain growth, and these factors are likely to contribute to the survival of the bacteria within the host's body. The Cry insecticidal proteins were identified at the beginning of the sporulation stage (Li et al., 2012). Approximately 830 proteins and 1700 peptides (of total protein content of 4.0718 Bt strain) were also detected in the late stages of sporulation of the bacterial life cycle in two-dimensional LC-MS/MS studies. The proteomics results showed that a total of seven out of 15 insecticidal proteins in this strain, were introduced as new toxins (Yang et al., 2015).

Today, more than 500 cell lines of insects derived from different tissues of insects (belonging to different orders) have been isolated and are maintained in laboratory conditions. Insect cell lines are used as a research tool in virology studies, and also to study signaling mechanisms in the immune system, gene expression, and in screening programs for the discovery of insecticidal toxins (Smagghe et al., 2009). The use of cell lines instead of insect colonies can overcome the problems of rearing the insect colony, insect diet preparation, growing the plant, time, money and cost for insect maintenance, quarantine issues, the inaccessibility of all species. As a result, many researchers have begun to use the insect cell lines. The use of insect cell lines can be particularly useful in screening studies, when is necessary or interesting to check the effect of a large number of toxins or bacterial strains on a large number of insects to determine the range of toxin activity or the insecticidal activity of a Bt strain. Also, insect cell lines are important from

the point of view of examining the effect of single Bt toxins (Portugal et al., 2014; Chen et al., 2015; Willcoxon et al., 2016; Portugal et al., 2017).

The cytotoxic activity of 1744 Bt strains was investigated against human cancer cells by Mizuki et al., (1999). From these 1744 Bt strains, 1684 strains did not have any hemolytic activity and 42 strains were toxic for human cancer cells. Parasporins extracted from these strains did not have insecticidal properties against lepidopteran insects.

The effect of Bt δ -endotoxins on eight different insect cell lines was investigated. The insect cell lines derived from *Manduca sexta* and *Choristoneura fumiferana* showed the highest susceptibility to δ -endotoxins. Based on the results, it can be concluded that the study of the toxic effect of Bt toxins on the insect cell lines is a convenient and fast method to study their toxicity, but the response of insect cells to Bt toxin in laboratory conditions is often different from the results of bioassays on the insects (Gringorten et al., 1999).

MATERIALS AND METHODS

2.1. BACTERIAL STRAINS

In total, 130 Iranian Bt strains were used in this study. Among the examined Bt strains, 88 strains were selected from the Bt collection of Biological Control Laboratory, Plant Protection Department at the University of Tehran and 42 strains were collected during sampling for this thesis. Also, in this research work, the two standard Bt strains HD-1-S-2005 and HD-2, prepared by the ERI of Biotechnology and Biomedical Sciences at the University of Valencia, Spain, were used as reference. The sequence, number and type of insecticidal genes of these two reference strains have been already described and published. In addition, different strains (DH5 α and BL21) of *Escherichia coli* were used as competent cells for cloning and expression of Bt *cry* genes.

2.2. INSECTS

In this thesis, larvae of eight different species of lepidopteran pests and one coleopteran pest were used for bioassay experiment and oligomer formation assays. Among the pests used, four species of *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* belong to the Noctuidae family. *Grapholita molesta* and *Lobesia botrana* are from the family Tortricidae. The two species of *Plodia interpunctella* (belonging to the family Pyralidae) and *Ostrinia nubilalis* (Crambidae family) were also used in this study. Also, *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) was used for oligomer formation assays of Bt toxins. All insects used in this research were reared on artificial diet (McGaughey and Beeman 1988; Lozzia and Manachini 2003; Ruiz de Escudero et al., 2007; Hernández-Martinez et al., 2008; Bel et al., 2011; Gomis-Cebolla et al., 2017), and kept at an appropriated condition under temperature conditions of 25 ± 3 ° C, relative humidity of $5 \pm 70\%$ and photoperiod of 16: 8 hours of light: darkness.

2.3. INSECT CELL LINES

In this study, four cell lines originated from tissues of insect pests belonging to the Noctuidea family were used to study the effect of Bt toxins (Table 2.1).

Table 2. 1. Names of used insect cell lines.

Cell line	Insect	Derived tissue	Reference
BTI-Tn-5B1-4 (Hi5)	<i>Trichoplusia ni</i>	Ovarian cells	Granados <i>et al.</i> , 1994
RP-HzGUT-AW1	<i>Helicoverpa zea</i>	Gut	Goodman <i>et al.</i> , 2004
UCR-SE	<i>S. exigua</i>	Larvae	Gelernter and Federici 1986
Sf21	<i>S. frugiperda</i>	Ovary	Vaughn <i>et al.</i> , 1977

The cell lines were maintained in incubators at 25 ± 2 ° C. The HzGUT and UCR-SE cell lines were cultured in Excell (Sigma-Aldrich) culture medium enriched by fetal bovine

serum (FBS) 5%. For maintenance of the Hi5 and Sf21 cell lines, TNM-FH (Sigma-Aldrich) cell culture media with 5% FBS and Grace's (GibcoTN) with 10% FBS, respectively, were used.

2.4. SAMPLE COLLECTION

Sampling of dead or diseased larvae, and also soil from diverse sourced including; forest, fruit trees garden, agricultural lands and natural vegetation areas were collected from Mazandaran, Guilan and Alborz provinces. For sampling from the soil, the extra materials from the surface of the soil was removed, then at an appropriate distance from the surface (at a depth of 5 to 15 cm), samples were collected. The samples should be taken to the lab in a plastic bags with the label of information on origin, location and date of sampling.

The dead and diseased insect larvae that were likely to die from bacterial infection, were collected and transferred to the laboratory inside glass tubes. A total of 24 soil samples and infected larvae were collected and Bt was isolated from them.

2.5. ISOLATION OF Bt STRAINS

For isolation of Bt isolates from soil samples, sodium acetate selective was used (Travers, 1987). The basis of this method is that the germination of spores of Bt isolates is selectively inhibited by 0.35 M sodium acetate, while the spores of other spore-forming bacteria are able to germinate. Then, by treating the samples containing the bacteria that their spores germinate, as well as the bacteria that are not essentially capable of producing spores, by heat for seven min at 80°C. As a result, following the heat treatment all the bacteria whether those their spores germinate and those non-spore forming bacteria are eliminated. Consequently, after heating the sample, only Bt isolates will remain in the sample. The methodology consisted in sieving the samples, then use one gram of soil and add it to a sterile test tube containing 10 ml of sodium acetate (35 M). The samples were incubated for 4 hours in sodium acetate and every 10 minutes the tubes were shaken thoroughly. Then, test tubes containing sodium acetate and soil were transferred to a warm bath and stored for at 80 °C for seven minutes. Ten µl of the solution extracted from the hot water bath, which probably contains only Bt spores, was cultured on a plate

containing a nutrient agar (NA) medium (containing five grams of peptone, three grams of meat extract and 15 grams of agar per liter of culture media). The plates were incubated at 30 °C for 24 hours.

To isolate Bt from insects, the dead and alive larvae suspected to be infected were first disinfected in 0.2% sodium hypochlorite, 70% alcohol and distilled sterilized water. Then the larvae were dissected to take out the material inside the larvae. The dissected larvae were cultured in Nutrient Agar plates. After incubation at 30 °C for 24 hours, if the larvae were contaminated with Bt, white to milky bacterial colonies appeared on the culture medium.

After isolation of the bacteria from the soil, dead and diseased larval samples, Bt colonies grown on the nutrient agar plates were characterized and described in terms of their appearance and morphology (colony color, colony surface view, growth pattern, margin and colony growth) of the bacterial colonies. The individual colonies were isolated and transferred into a new culture medium. Then, bacterial colonies that were similar to Bt, were firstly confirmed by microscopy observation to check the presence of spores and crystals using a phase-reference microscope (Zeiss Axiophot 20, Germany), and then were submitted to Gram staining and catalase test. The colonies classified as Bt, were named (under the name of the collecting site and the host plant), and subsequently cultured. In order to carry out supplementary studies, the isolates were stored at -20 and -80 ° C, for short and long-term storage, respectively.

2.6. STORAGE OF BACTERIAL CULTURES

For short and long term storage of Bt isolates, samples were frozen with glycerol (to preserve the cells in cool storage). First, bacterial isolates of Bt were cultured in Petri dishes containing CCY medium (Stewart et al., 1981) and kept at 29 °C for one night. Ten ml of CCY liquid medium were inoculated with a fresh single colony of Bt, and kept for two days at 29 °C and 200 rpm in a shaker incubator. Then the presence of the spores and crystals was checked by microscopy observation. When the presence of spores and crystals was observed in about the 90% of the bacterial cells, thermal treatment was

performed (70 ° C for 20 minutes) for synchronization. After cooling the culture medium containing bacteria, glycerol storages of 50% and 20% were prepared for storage of bacterial isolates at temperatures of -20°C and -80°C, respectively. To store the Bt isolates at -20 °C, 500 µl of bacterial culture medium was added to 500 µl of autoclaved glycerol in sterile cryotubes. Similarly, for storage at -80 ° C, 850 µl of culture medium was added to sterilized cryotubes containing 150 µL of autoclaved glycerol. The contents of the vials were slowly mixed with vortexing for 10 seconds and then placed into liquid nitrogen for a few minutes. Finally, protected bacterial strains were transferred to cryotube storage boxes to the corresponding freezers.

2.7. DETERMINATION OF THE BACTERIAL MORPHOLOGY

The identification key used to detect 22 important species of *Bacillus* species, was based on Thiery and Frachon (1997) key, and was performed according to the minimum phenotypic characteristics of the cells. The identification key is presented in Figure 2.1. Then, according to the morphological characteristics of the reproductive stage of the bacterium and the observation of spores and crystals, the diagnosis of Bt was established, also taking into account the results of the Gram staining and catalase tests.

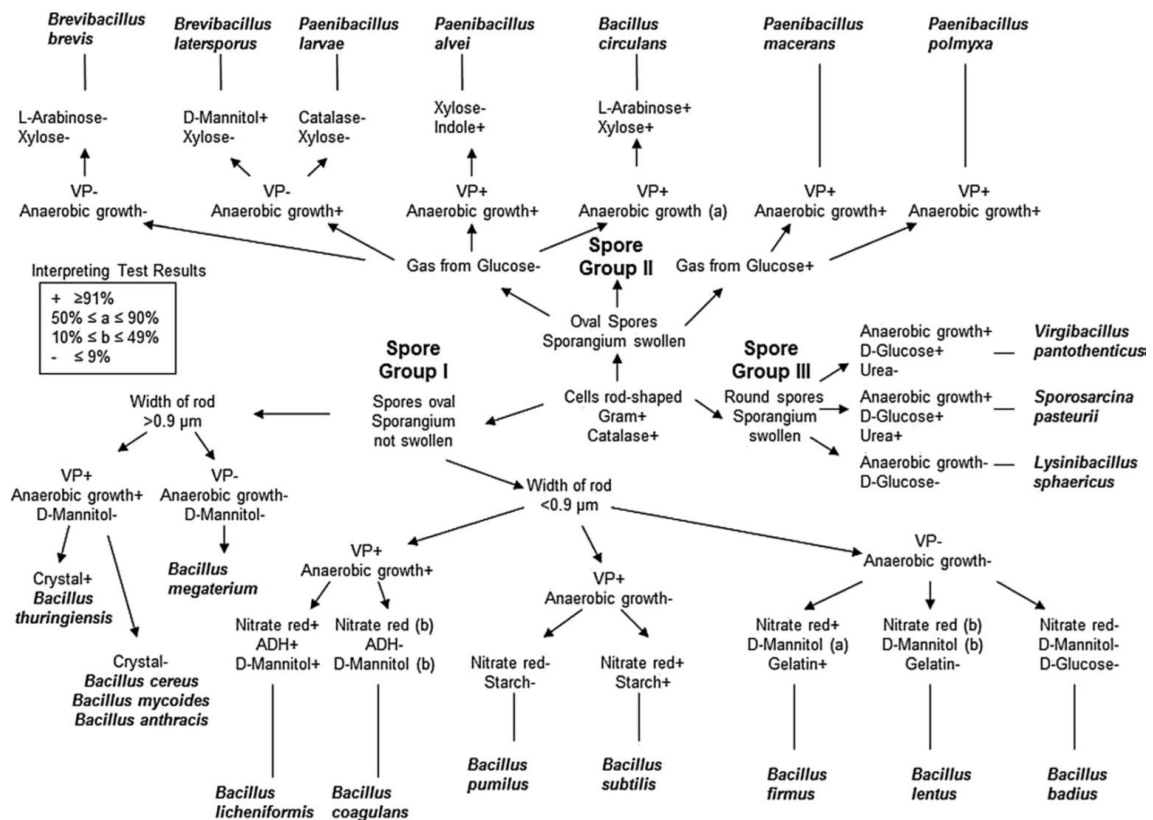


Fig. 2. 1. Identification key of the major groups of *Bacillus* spp. bacteria (Thiery and Frachon, 1997).

2.8. GRAM STAINING

After microscopic observation of bacterial morphology and basal identification of the bacteria, a gram staining test was performed to detect the gram positive or gram negative results of the isolates. The cultured petri dishes were incubated at 30 °C for 16 to 18 hours. Then, at a time when the bacterium is in the vegetative growth stage, in sterile conditions, a bacterial colony is removed and mixed with a drop of sterilized sterile water on a clean slide. When the mixture of cells and water was dried in the vicinity of the flame, the sample was fixed for 1 minute in crystal violet dye solution (1 g in 100 ml) and then in a 1 minute iodine solution (1 g in 20 ml). Then the extra color was washed with 90% ethanol. The sample was kept at a 45 ° angle and the drop of alcohol dropped over the slide until the last drop of color dropped out, then the slide was washed immediately with

distilled water. In the next step, the bacterial smear was placed in a fuchsine colored solution (0.1 g in 100 ml) for 15 seconds and then washed immediately with distilled water. After the slide was dried, the sample was observed under microscope at a magnification of 1000. For comparison and as a control of gram-negative bacteria, *Pseudomonas* sp., was used. As a result, the gram-positive bacteria become dark in violet, while the gram-negative bacteria become pink.

2.9. CATALASE TEST

Aerobic bacteria that require oxygen for metabolism use hydrogen catalase to convert hydrogen peroxide (H_2O_2) into water and oxygen and produce oxygen. In order to detect the presence of catalase in bacterial isolates, diluted hydrogen peroxide was added to the fresh bacterial culture. The rapid appearance of oxygen bubbles confirmed the presence of catalase enzyme in the isolate. The methodology consisted in preparing fresh 16-18 hours cultures from bacterial isolates in nutrient agar medium. The volume of 200 μ l of hydrogen peroxide (3 to 6%) was transferred to a clean micro-tube. Using a sterile loop, a single colony of bacteria was removed and transferred to the micro-tube wall adjacent to hydrogen peroxide. When the diluted hydrogen peroxide reaches a bacterial extent and, if there is a catalase enzyme, oxygen bubbles appear and the colony is classified as catalase positive.

2.10. IDENTIFICATION OF *BACILLUS* spp. GROUP

The isolates were examined for the shape of spore and sporangium (bacterial cell) according to Thiery and Frachon (1997) identification keys. In this key, *Bacillus* species are classified into three groups based on the morphology of spores and sporangium (Fig. 2.2). The first group (I) produces an ovoid endospore that does not cause swelling of the rod-shaped cell, which is itself divided into two categories: in the first group, the cell width is greater than 0.9 μ m such as Bt and the second group has a cell width of less than 0.9 μ m, such as *B. subtilis*. The second group of *Bacillus* species produce ovoid

endospores that cause swelling of sporangium, such as *Brevibacillus* and *Paenibacillus*. The third group has spherical spores with swollen sporangium, such as *Lysinibacillus* (Thiery and Frachon, 1997).

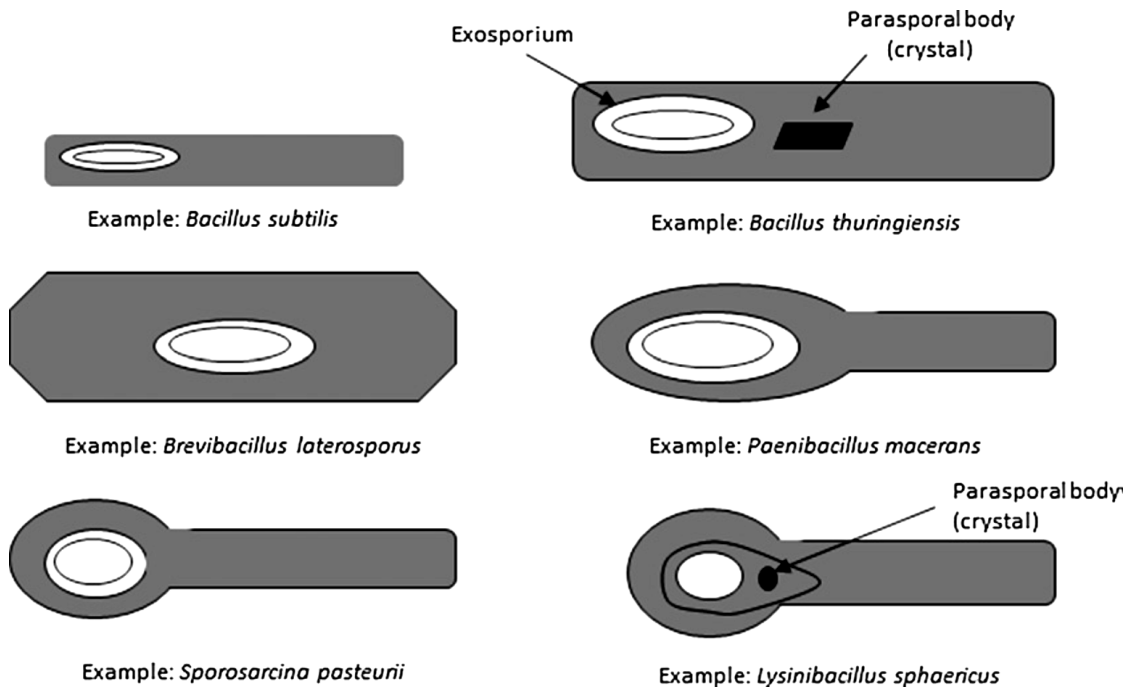


Fig. 2. 2. The morphological characteristics of *Bacillus* spp. (Thiery and Frachon, 1997).

2.11. SCREENING OF Bt ISOLATES BASED ON THE TOXICITY ON *P. INTERPUNCTELLA*

Initial screening of 130 Iranian Bt isolates, was based on their toxicity to the second instar larvae of *P. interpunctella*. To prepare the bacterial suspension, the Bt isolates were grown on nutrient agar and kept in incubator for 4 days at 29 °C. After four days, the presence of spores and crystals was observed by microscopy, and the destruction of the wall of 90% of the bacterial cells (cell lysis) was initially confirmed. Then, the bacteria were grown on a culture medium under sterile conditions, collected by sterile loop and added to a suitable volume of sterile distilled water. After preparation of the serial

dilution, the concentration of bacterial suspension was determined by counting the number of spores by means of hemocytometer (counting-chamber). This method of determining the concentration is an estimation of the number of Bt spores per ml of suspension. Also, by placing the microscope in the phase contrast state, at a magnification of 1000, using the immersion oil, the number of crystals was also estimated. To determine appropriate concentration, 2 ml of five different concentrations (from 10^4 to 10^8 cells/ml) of Bt spore and crystal suspension of AzLp Bt strain were incorporated into 2 mg of Indian meal moth artificial diet containing wheat bran, yeast, glycerol and honey (McGaughey and Beeman 1988). The mixture was air-dried and used to feed second instar larvae of *P. interpunctella*. According to LC_{50} calculated by probit analysis using Polo-Plus, other screening bioassays were performed with single concentration of 10^8 cells/ml (higher than LC_{50}) against second instar larvae of *P. interpunctella*. Assays were carried out using 20, second instar larvae of Indian meal moth per concentration with three replicates. Water was used as a negative control. Mortality was recorded 72 hours after treating the larvae with Bt.

Based on the results of primary screening, the 130 Iranian Bt strains were categorized into three toxicity groups: 1. the group with high toxicity: Bt strains with a potential to cause over 67% mortality on *P. interpunctella* larvae. 2. Moderate toxicity group: mortality between 34 to 66%, and 3. low toxicity group: strains that caused less than 33% of mortality. Seven Bt strains (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, RM, and KhF) were selected from all three groups and were studied comprehensively and fully by using multiple methods. Among these seven strains, five Bt strains (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp) belong to the high toxicity group. In order to compare the characteristics of these five strains, other two strains selected from the group with moderate or low toxicity were included: the KhF and RM strains, respectively. Other characterization studies performed in this thesis were done on these selected seven Bt strains.

2.12. COMPARISON OF PROTEIN PROFILES OF Bt STRAINS

The first step for the characterization of the seven selected Bt strains, was the analyses of the number and molecular weight of the proteins found in their respective crystal inclusions. In short, the procedure started with the isolation of the spores and crystals

from the Bt culture media, and then, after several steps of centrifugation and washing, the crystals were isolated and dissolved in solubilization buffer at room temperature. A part of the protoxin obtained was activated with trypsin enzyme. Finally, the protein profiles of protoxins and activated toxins of each one of the Bt strains were analyzed on SDS-PAGE.

The solubilization of the crystal proteins was performed according to the protocol provided by Estela et al. (2004). Bt strains were cultured on CCY agar medium and incubated at 29 °C for 2 days. Then, from 5 to 20 ml of CCY liquid medium, was inoculated with a colony of Bt grown on the solid CCY medium (pre-culture). The pre-culture was incubated for about two days in an incubator (with shaker ranging from 180 to 200 rpm) at 29 °C. After two days, the presence of spores and crystals was observed by microscopy. If the presence of spores and crystals is confirmed, the thermal treatment was applied for 20 minutes at 70 °C (in the absence of the spores and crystals, pre-culture is incubated for a longer period of time). The reason for applying heat treatments is to prevent contamination and to create synergistic growth in bacterial cells. Because at this temperature, the vegetative form is destroyed and only the spore remains. The final culture was prepared by inoculation of 200 ml of CCY liquid medium, with 5 ml of the pre-culture that had been heat treated. The final culture was kept at 29 °C and 180 rpm for two days, until 90% of the bacterial cells were lysed. The culture was then centrifuged for 12 minutes at 6000 $\times g$ at 4 °C (Beckman Coulter Centrifuge, Avanti™ J-20 XPI) and crystals were isolated from the medium and the rest of the cell debris. The pellet was washed twice with 1 M NaCl and washed with 10 mM EDTA. All of these steps were carried out on ice. A centrifugation of 12 minutes at 17000 $\times g$ 4 °C was performed for each washing step. In the last washing step, 10 mM KCl was added and the sample was centrifuged at 4 °C for 15 minutes at 24000 $\times g$. At the end of this step, the Bt crystals were separated from the spores, and in the next step, the crystals should be dissolved in the solubilization buffer 50 mM carbonate buffer Na₂CO₃ and 10 mM DTT, at pH 10.5. The solubilization buffer was added to the pellet and mixed thoroughly. The resulting mixture was incubated at about 60 rpm at room temperature for two hours. After centrifugation at 24000 $\times g$, for 15 minutes at 4 °C, the soluble protein in the sample was transferred to a clean Falcon tube. The soluble protein from crystals was passed through a 0.2 μm filter (GE Healthcare Whatman™, United Kingdom). The concentration of

soluble protein, which is the Bt protoxin whole content, was determined by Bradford method (Bradford, 1976). Activation of Bt-protoxin was performed by adding trypsin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10% w/w, and incubating the sample in a hot water bath with a temperature of 37 °C for two hours. Then, the protoxin and toxin profiles of Bt strains were analyzed and compared by SDS-PAGE.

2.13. DETERMINATION OF CRYSTAL PROTEIN COMPOSITION OF Bt STRAINS BY LC-MS/MS

In the previous section, the molecular weight and number of proteins found in Bt crystals were determined by analyzing SDS-PAGE. But the protein pattern obtained by SDS-PAGE alone is not enough, because it is possible that several proteins have the same molecular weight. Also, the relative frequency of each protein in the crystals of Bt plays an important role in predicting the insecticidal potential of that strain. As a result, proteomics analysis by LC/MS-MS method is a suitable method for identifying the content and composition of proteins present in the crystalline bodies of Bt strains. Proteomics studies were conducted at the Servei Central de Suport a La Investigació Experimental (SCSIE) of the University of Valencia. The solubilized crystals from Bt strains, which were in the form of a protein mixture, were completely digested with the trypsin enzyme to obtain peptide mixture (Promega). The protein mixture was diluted 1:4 with 2.5 mM DTT, 50 mM NH₄HCO₃ and 11 mM DTT and after several incubation steps of 20, 30 and 30 minutes at 60 °C, the trypsin enzyme was increased to 1:10 (w/w) and sample was incubated at 37 °C for one night (12 to 16 hours). By adding seven µl of trifluoroacetic acid (TFA), protein digestion by trypsin was stopped. All the samples were concentrated in a speed vacuum. Then, 5 µl of each sample was loaded onto a trap column (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 100 µm x 15 cm; Nikkyo) and desalted with 0.1% TFA at 2µl/min during 10 min. The peptides were loaded onto an analytical column (LC Column, 3µ C18-CL, 75µm x 12cm, Nikkyo) equilibrated in 5% acetonitrile 0.1% formic acid (FA). Peptide elution was carried out with a linear gradient of 5 to 40% B in 45 min (GC) (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) at a flow rate of 300 nl/min. Peptides were analyzed in a mass spectrometer nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). The tripleTOF was

operated in information-dependent acquisition mode, in which a 0.25-s TOF MS scan from 350–1250 m/z, was performed, followed by 0.05-s product ion scans from 100–1500 m/z on the 50 most intense 2-5 charged ions. The MS/MS information was sent to PARAGON via the Protein Pilot v 4.5 (ABSciex). ProteinPilot default parameters were used to generate peak list directly from 5600 TripleTof wiff files. The Paragon algorithm of ProteinPilot was used to search NCBI protein database with the following parameters: trypsin specificity, cys-alkylation, no taxonomy restriction. To avoid using the same spectral evidence in more than one protein, the identified proteins were grouped based on MS/MS spectra by the Protein-Pilot Progroup algorithm. Thus, proteins sharing MS/MS spectra were categorized, regardless of the peptide sequence assigned. The protein within each group that could explain more spectral data with confidence was shown as the primary protein of the group. Only the proteins of the group for which there was individual evidence (unique peptides with enough confidence), were listed. Proteins identified by LC-MS/MS with a confidence level of at least 95% were considered significant and gave a score of 1.3. Protein value or protein score was calculated. The percent confidence and protein values corresponding to them are given in Table 2.2.

$$\text{ProtScore} = -\log\left(1 - \frac{\text{Percent confidence}}{100}\right)$$

Table 2. 2. Confidence intervals for protein score.

Protein Score	Confidence Percentage
2	99%
1.3	95%
1	90%
0.47	66%

As a result, proteins with a confidence level of at least 95, were selected. Among the remaining proteins in the identification list, there were proteins that have an insecticidal effect or are involved in the toxicity of the Bt strains, and for each one of them, several distinct, and specific peptides had been identified. Finally, the selected proteins of the list were confirmed through the alignment tools in the NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.14. DETERMINATION OF GENE CONTENT

In order to know the genetic content of Bt strains, one of the common methods for Bt strains identification was used: the polymerase chain reaction (PCR). PCR-based screening can accurately and quickly determine the genetic content of bacterial strains (Carozzi et al., 1991; Juárez-Pérez, et al., 1997; Ferrandis et al., 1999).

2.14.1. DNA EXTRACTION

The extraction and purification of total genomic content was performed following Ferrandis et al. (1999). To identify the gene content, the entire genome, both plasmid and chromosomal DNA was extracted from each Bt strain. Thus, overnight culture of Bt strains was made in CCY agar medium. Single-colonies were selected and inoculated with four ml of LB medium. The liquid culture was prepared in an incubator shaker for one night at 29 °C at 180 rpm. The grown bacterial cells were separated from the culture medium through centrifugation for 10 minutes at 5000 rpm at 4 °C. To extract the DNA, the Qiagen kit, DNeasy Blood & Tissue Kit (Hilden, Germany) was used, according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of DNA extracted was also investigated.

2.14.2. PRIMER DESIGNING

For identification of Bt strains gene content, our investigation was firstly focused on the genes that code the proteins that do not have the ability to accumulate in the crystals of Bt strains, such as Vip and Sip proteins, which are bacterial vegetative and secreted proteins. Also, the CryII protein, that although belongs to the Cry protein group and to the CryI family, does not have the ability to crystallize and accumulate in crystal proteins of the Bt. As a result, specific primers for *cryII* genes (Nazarian et al., 2009), *vip1* and *vip2* (Hernández-Rodríguez et al., 2009), *vip3* (Djanane et al., 2017) and *sip1* genes (present study), were prepared. Then, using the general primers, the genes *cry1* and *cry2* (Ben dov et al., 1997), *cyt1* (Bravo et al., 1998), *cyt2* (Guerchicoff et al., 2001), *ps1* (Yasutake et al. 2007), *ps2*, *ps3* and *ps4* (Lenina et al., 2014). The *cry1* gene fragments (from the *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* and *cryIAd* genes (Juárez-Pérez et al., 1997), *CryIAG* (present research), *cryIC* (Cho et al., 2001), *cryID* (Juárez-Pérez et al., 1997), *cryIG*, *cryIH* and *cryII* (present study) were amplified using general published primers or primers designed in this work (Table 2.3). The PCR technique was also used for confirmation of proteomics results. Primer design was done using the Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) and SnapGene Viewer software. Qualitative and technical control of all designed primers including primer length (number of nucleotides), molecular weight, secondary structure (hair pin), failure to create dimer, melting temperature and content of cytosine and guanine, and synthesis of primers were verified by Sigma-Aldrich website. The list of primers used in this essay is given in Table 2-3.

Table 2. 3. The list of primers used in this study.

Reference	Product size (base pair)	Melting temperature (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
Ben dov <i>et al.</i> , 1997	274-277	67.2	CATGATTCATGCGGCAGATA AAC	<i>cry1</i>	<i>Un1-f</i>
		66.7	TTGTGACACTTCTGCTTC CCA TT		<i>Un1-r</i>
Nazarian <i>et al.</i> , 2009	1000	48.1	ACAATTTACAGCTTATTAAG	<i>cry11</i>	<i>Cry11-f</i>
		51.8	CTACATGTTACGCTCAATAT		<i>Cry11-r</i>
Ben dov <i>et al.</i> , 1997	689-701	63.3	GTTATTCTTAATGCAGATGA ATGGG	<i>cry2</i>	<i>Un2-f</i>
		61.1	CGGATAAAAATAATCTGGGA AATAGT		<i>Un2-r</i>
Bravo <i>et al.</i> , 1998	522	68.2	AACCCCTCAATCAACAGCA AGG	<i>cyt1</i>	<i>Cyt1-f</i>
		63.9	GGTACACAATACATAACGC CACC		<i>Cyt1-r</i>
Guerchicoff <i>et al.</i> , 2001	469	51.3	AATACATTTCAAGGAGCTA	<i>cyt2</i>	<i>Cyt2-f</i>
		48.4	TTTCATTTTAACTTCATATC		<i>Cyt2-r</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	585	70.9	TTATTAGATAAACAACAAGAATATCAATCTATTMGNT GGATHGG	<i>vip1</i>	<i>Vip1-sc.fw</i>
		69.2	GATCTATATCTCTAGCTGCT TTTTCATAATCTSARTANGG RTC		<i>Vip1-sc.rev</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	845	61.2	GATAAAGAAAAAGCAAAAAG AATGGGRNAARRA	<i>vip2</i>	<i>Vip2-sc.fw</i>
		65.8	CCACACCATCTATATACAGT AATATTTTCTGGDATNNG		<i>Vip2-sc.rev</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	1395	54.2	TGCCACTGGTATCAARGA	<i>vip3</i>	<i>Vip3-sc (f)</i>
Djenane <i>et al.</i> , 2017		71.1	CCATTAATYGGAKTCAAAA ATGTTTCACTGAT		<i>Vip3-scII (r)</i>
Yasutake <i>et al.</i> , 2007	1135	56.3	ATCAAGAATTTTCCGATAAT C	<i>ps1</i>	<i>Ps1-f</i>
		57.6	CCAAAAGTGCCAGAATG		<i>Ps1-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	503	62.1	TGTTGGGACTGTTCAGTACG T	<i>ps2</i>	<i>Ps2-f</i>
		60.7	CGTCACGGTACCTCTTAGTG T		<i>Ps2-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	701	65.4	GGAATCCAGGTGCACTGCT	<i>ps3</i>	<i>Ps3-f</i>
		66.9	GTCCCGGATCATAACGTTGGA		<i>Ps3-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	681	67.6	AGTGGTCTCCAGGCTCATAC TGG	<i>ps4</i>	<i>Ps4-f</i>
		68.5	TGATATTCCCGAACCTGCC T		<i>Ps4-r</i>

Continued table 2.3. The list of primers used in this study.

Reference	Product size (base pair)	Melting temperature (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
In current work	541	64.1	TCAAGCATGTCAGCTTTTGC	<i>sip1</i>	<i>Sip1A70D</i>
		63.7	CCAGCCAAAGCAACTACTCC		<i>Sip1A611R</i>
	420	63.3	TGCTGCTAAGGGAGTAGTTG C	<i>sip1</i>	<i>Sip1A582D</i>
		67	TGTAAATTCGGCCGGGGTAT		<i>Sip1A1002R</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1286	62.5	TTCCCTTTATTTGGGAATGC	<i>cry1Aa</i>	<i>IAa</i>
		45.7	MDATYTCTAKRTCTTGACTA	<i>cry1</i>	<i>I(-)</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1371	61.9	CGGATGCTCATAGAGGAGA A	<i>cry1Ab</i>	<i>IAb</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	844	54.6	GGAAACTTTCTTTTAAATGG	<i>cry1Ac</i>	<i>IAc</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1212	56.2	ACCCGTA CTGATCTCAACTA	<i>cry1Ad</i>	<i>IAd</i>
In current work	1027	62.1	TCCGATTATGTTGTGGAATT G	<i>cry1Ag</i>	<i>Cry1Ag-1F</i>
		62.2	ATGTGGTTGCCTATATTCTG GTT		<i>Cry1Ag-1R</i>
	1193	60.1	CACTTACTGTATTAGATATC GTTGCTC		<i>Cry1Ag-2F</i>
		63.1	ACCCGATTTGATTGGAAGAA		<i>Cry1Ag-2R</i>
	1172	62.2	TCCGTTTAACTTTTCAAATG GAT		<i>Cry1Ag-3F</i>
		62	CGCCCTTCTAATTCTTCAAA A		<i>Cry1Ag-3R</i>
	942	60.6	TCGTTTATAAAGAGGCAAA AGAA		<i>Cry1Ag-4F</i>
		63.7	GAGGTGATGTCCGTTTTTCA TTA		<i>Cry1Ag-4R</i>
Cho <i>et al.</i> , 2001	1050	59.4	GGAGAAAGATGGGGATTG	<i>cry1C</i>	<i>Cry1C-f</i>
		57.2	AACTCGTGCATCCCTACT		<i>Cry1C-r</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1138	61.5	CAGGCCTTGACAATTCAAAT	<i>cry1D</i>	<i>Cry1D</i>
In current work	1244	61.9	GTTATGCCATGCTAGATTTG CTA	<i>cry1H</i>	<i>Cry1H-f</i>
		62.5	ACCCATACACCTAAGTCCTC ATT		<i>Cry1H-r</i>
In current work	713	51.8	ATTACGAYATCCGAACATA	<i>cry1G</i>	<i>Cry1G-f</i>
		51.5	CTGTAAAWCCTGGTCCT		<i>Cry1G-r</i>

2.14.3. POLYMERASE CHAIN REACTIONS

To amplify the desired genes using general or specific primers, a 25 µl reaction mixture was prepared as described in Table 2.4. In this reaction, the DNA taq polymerase enzyme manufactured by the Biotools Company and the standard buffer containing 50 mM MgCl₂

were used. Thermal conditions of polymerase chain reaction was performed according to Table 2-5 and in Eppendorf Mastercycler thermal cycler. The products obtained from the polymerase chain reaction were examined on a 1% agarose gel in a Tris-borate-EDTA buffer system. The amplified fragments were extracted from the gel or from the final PCR reaction mixture by NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit kit, and sent to Stab Vida for sequencing. Editing and analyzing of the resulting sequences were performed using Geneife software (version 10.0.9) and the NCBI database.

Table 2. 4. The amounts and concentration of used materials for PCR reaction mix.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/µl	1	0.04 U/µl
dNTPs mix	10 mM	1	0.4 mM
Forward primer	10 µM	1	0.4 µM
Reverse primer	10 µM	1	0.4 µM
Template DNA	100 ng/µl	1	4 ng/µl
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

Table 2. 5. Thermal conditions of polymerase chain reaction.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	45-67	45-60 sec	25-35
Extension	72	1-2 min (60 sec / 1Kbp)	
Final extension	72	10 min	1

2.15. β -EXOTOXIN PRODUCTION

The existence or absence of beta-exotoxin was determined by LC-MS/MS in the Department of Proteomics, University of Valencia (SCSIE), and the technique was applied to the bacterial cultures of the seven studied Bt strains. Preparation of samples was done following Hernández et al. (2003). In short, 10 ml of CCY liquid culture was inoculated with a bacterial colony of Bt and kept at a temperature of 28 °C for 48 hours on a shaker (180 rpm). After 48 hours, the samples were centrifuged for 10 minutes at 9000 $\times g$. The supernatant was transferred to a clean tube and autoclaved for 20 minutes at 120 °C. The samples were again centrifuged for 10 minutes at 9000 $\times g$. The supernatant was passed through a 0.2 micrometers filter. The standard curve was obtained by using different concentrations (12.5, 25, 50 and 100 $\mu g/ml$) of pure beta-exotoxin (Beta-Exotoxin (Type-1) from *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 (Berliner), kindly supplied by Isabelle Thiéry). As positive controls, two Bt strains of (HD-2 and *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* VMA10.30) were assayed and HD-1 strain was used for negative control.

2.16. EVALUATION THE SPECTRUM OF INSECTICIDAL ACTIVITY OF Bt STRAINS FOCUSING ON LEPIDOPTERAN INSECT SPECIES

So far, gene content and crystal protein composition of seven Bt strains has been studied, and according to the information obtained, the the insecticidal activity of these Bt strains can be predicted. However, due to the possible interaction between active toxins with the midgut of the host larvae, supplemental bioassay experiments have to be performed for better identification of the range of insecticidal activity of Bt strains. Considering that the initial screening of 130 Iranian Bt strains was carried out based on their toxicity on *P. interpunctella* larvae, a lepidopteran pest, accordingly, the spectrum of insecticidal activity of seven selected Bt strains was also studied against different lepidopteran insect pests.

2.16.1. INSECT BIOASSAY

The toxicity of the seven selected Bt strains was assessed against *S. exigua*, *G. molesta*, *O. nubilalis* and *M. brassicae* larvae by surface contamination method (Hernández-Martínez et al., 2008). The bioassay experiments with Bt protoxins and activated toxin were carried out at a single concentration of 1000 ng/cm². Protoxin and Bt-activated toxin were prepared according to the previous section (paragraph 3.2). The concentration of protoxin was quantified by Bradford (Bradford, 1976) and the concentration of trypsin-activated toxins was calculated after separation in the SDS-PAGE gel, using a densitometry method using TotalLab Quant software (version 12.3) using serum albumin (BSA) protein as standard. Samples of protoxin and active toxin of each strain were prepared at a concentration of 1000 ng/cm². Bioassay experiments were carried out in plastic trays of 128-wells (surface area of each well is 1 cm²). A volume of 50 µl of protoxin or toxin-activated protein was added to each well. The bioassay trays were placed under the hood with a gentle stream of air to dry. When the protein solution (protoxin or active toxin) was dried, one larva of 1st stage was transferred to each well. Bioassay tests were performed in triplicate and 48 larvae were used in each replicate. The number of dead larvae was recorded after seven days and the percentage of mortality was calculated. For negative control, to the surface of the artificial diet, 50 µl of 50 mM carbonate buffer at pH 10.5 was added. Bioassay trays were incubated at 25 ± 1 °C, with relative humidity of 60 ± 5% and 16 hours light / eight hours darkness.

2.17. CELL VIABILITY ASSAY

Cytocidal activity of selected Bt strains was investigated in three different aspects: microscopic observation, single dose assay and dose response assay. The cell viability assay was performed using a CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, which is based on tetrazolium salts (MTT- 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction method. The tetrazolium salts reduction method is a colorimetric method that determines the number of viable cells. The tetrazolium

compounds processed by living cells become a colored substance called Formazan, which is soluble in cell culture media (Figure 2-3). This transformation of the tetrazolium salt into the formazan compound is bio-reduced by NADPH or NADH produced from the dehydrogenase enzymes of the cells that are metabolically active. The amount of formazan produced is measured by absorbance at 490 nm wavelength. The amount of measured formazan is a proportional of the number of living cells present in the cell culture medium.

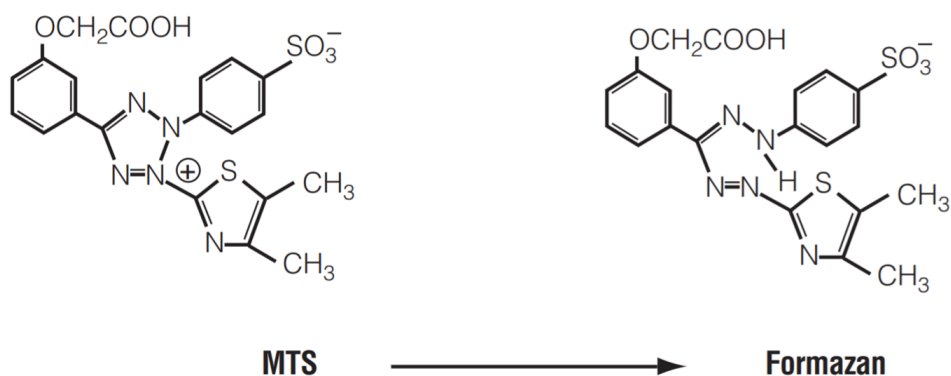


Fig. 2. 3. Transformation of tetrazolium salt into the formazan compound (Fotakis and Timbrell, 2006).

The cytotoxic activity of the toxins from the selected Bt strains was investigated against four different lepidopteran insect cell lines: Sf21, Hi5, UCR-SE and HzGUT. The target cell lines were kept in 25 centimeters cell culture flasks with a culture medium suitable for insect cells containing FBS. For the cell viability assay, the previous culture medium containing FBS was removed and fresh culture medium without FBS was added to the flask. The confluent monolayer of insect cells were mixed gently with fresh culture media to provide a uniform suspension of the cells. The concentration of prepared cell suspension was determined by Countess Automated Cell counter (Invitrogen). Ten microliters of cell suspension were well mixed with 10 μ l of blue trypan blue in a clean micro-tube and 10 μ l of the resulting mixture was analyzed in the Countess Automated

Cell counter. The microscopic slide of this device are made up of two separate compartments A and B, for repeating the concentration determination. The total cell count is 0.4 μl , equivalent to four square 1 mm \times 1 mm of standard hemocytometer. the Countess Automated Cell counter calculates the total number of cells, the number of live cells, the number of dead cells and the percentage of live cells. The live cells had dark blue and dark margins after coloring with a trypan blue, but the dead cells were blue in color, because trypan blue has the ability to penetrate into the dead cell. Consequently, a concentration of 2×10^6 cells/ml was prepared from the cell suspension and 100 μl of the suspension concentration was added to each well from a 96-well plate. The plate containing the cells was incubated for at least two hours at 25 °C to allow the cells to have enough time to connect to the bottom of the well. The cell viability assay was carried out in two ways: 1. Single dose assay: The effect of protoxins and activated toxin of all Bt strains was investigated in only one concentration against all of the four cell lines. Based on the result of single dose assay, the most susceptible insect cell line and the most toxic Bt strains have been employed for performing the dose-response assay. 2. Dose-response assay: In this test, EC₅₀ of the target strain was determined using five concentrations of activated toxin of the most toxic Bt strains against the most susceptible cell line.

For single dose assay, 10 μl of protoxin at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 10 μl of active toxin at a concentration of 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ were added to each well of 96-well plate The cell viability was measured after 16 hours. In the dose-response assay, cells were treated with 10 μl of active toxin at the concentrations of 0.64, 3.2, 16, 80 and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The number of viable cells was recorded after six hours. After passing 16 and 6 hours of treating the cells with protoxin and activated toxin Bt, in single dose and dose-response assays, 20 μl of CellTiter 96® AQueous One Solution was added to each well and the plate was incubated for two hours. Then, the number of live cells was measured by measuring the absorbance at 490 nm wavelength in a spectrophotometer (Tecan infinite Pro200). In the negative control, the cells were treated with protein buffer (50 mM carbonate buffer, pH 10.5) and in the positive control cells were treated with 0.2% TritonX-100. The viability percentage was calculated using the following formula:

$$\text{Percentage of viability} = \left[\frac{(\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{positive control}})}{(\text{Absorbance}_{\text{negative control}} - \text{Absorbance}_{\text{positive control}})} \right] \times 100$$

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1. ISOLATION OF Bt STRAINS

In this thesis, a total of 130 Iranian Bt strains isolated from various environmental sources were used. Among the selected Bt strains, 88 strains were collected from Biological Control Laboratory, Plant Protection Department at the Tehran University and 42 Bt strains were collected from 24 samples of soil and dead insects. Bt strains were firstly isolated and identified by sodium acetate selective method and then the ability of Bt strains to produce parasporal crystalline inclusion bodies was studied. Finally, after the microscopic observation, Gram staining and catalase test, additional information was provided on the selected strains. As a result, after microscopic slide preparation and observation of rod-shaped bacterial cells, confirmation of presence of spores and crystals, confirmation of being gram positive and the presence of catalase enzyme, 42 Bt strains were found.

Due to the importance of Bt in the biological control of pests, many studies have focused on the isolation of this bacterium from a wide variety of environmental sources (Bel et al., 1997; Uribe et al., 2003; Berón and Salerno 2006; Seifinejad et al., 2008; Djenane et al., 2017). In this thesis, the characterization of Iranian Bt strains have been studied in terms of gene content and crystal protein composition, as well as the spectrum of insecticidal activity. In Iran, there are a few study focusing on isolation of Iranian Bt strains and characterization based on the diversity of Bt strains and identification of specific and active *cry*, *cyt*, and *vip* genes toxic for lepidopteran, coleopteran and dipteran insect pests, as well as nematicidal activity (Salehi Jouzani et al., 2008a; Salehi Jouzani et al., 2008b; Seifinejad et al., 2008; Nazarian et al., 2009).

2.3.2. PRELIMINARY SCREENING OF Bt STRAINS

The initial screening for 130 Bt strains was done based on the toxicity of the selected strains on second instar larvae of Indian meal moth, *P. interpunctella*, at a single concentration of 10^8 spores/ml. The selected discriminating concentration (10^8 spores per milliliter) for initial screening was determined based on the LC₅₀ value of the reference Bt strain, AzLp, which was previously proven to be toxic to other lepidopteran insect pests (*Plutella xylostella*, *Ectomyelois ceratoniae* and *Ephestia kuehniella*) (Khorramnezhad, 1391). The estimated LC₅₀ value for the AzLp Bt strain on the second instar larvae of Indian meal moth larvae was 2×10^6 spores per milliliter (Table 2-6).

Table 2. 6. Probit analysis of *B. thuringiensis* AzLp strain against second instar larvae of *P. interpunctella*

Bt strain	No.	Slope \pm SE	χ^2	df	LC ₅₀ (cells/ml)	C.I. 95%	
						Lower	upper
AzLp	360	5.316 \pm 0.510	2	13	2.1×10^6	1.4×10^6	3.2×10^6

Based on the results of primary screening, 130 Bt strains were classified into three groups based on their toxicity on second instar *P. interpunctella* larvae (Table 2-7).

Table 2. 7. Classification of Bt strains based on their toxicity on *P. interpunctella* larvae.

Sample habitat	Number of isolates causing mortality >67%	Number of isolates causing mortality 34-67%	Number of isolates causing mortality <34%
Infected larvae	5	0	0
Soil	2	4	120

Five Bt strains namely; IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp, isolated from infected larvae, besides two DCf and MCh Bt strains, were isolated from agricultural field (cauliflower) and fruit gardens (cherry trees) caused more than 67% mortality on second instar larvae of *P. interpunctella*, were classified into the most toxic group (Table 2-8). It is important to mention that 119 Bt strains showed the lowest toxicity (less than 34% mortality) for *P. interpunctella* larvae. Only four Bt strains, with a mortality percentage between 34% and 67%, were found in moderate toxicity group. Two strains of IP-2 and IEp, which were highly toxic to Indian meal moth larvae, were isolated from the infected larvae belonging to the Pyralidae family from the Lepidoptera order.

Table 2. 8. Toxicity of spore and crystal mixture (10^8 cells/ml) of Bt strains (Mortality% \pm SE).

Bt strain	Sample source	Mortality% \pm SE¹
IE-1	<i>Ectomyelois ceratoniae</i> larvae	67 \pm 3 ^{bc*}
AzLp	<i>Plodia interpunctella</i> larvae	68 \pm 6 ^{bc}
IE-2	<i>Ectomyelois ceratoniae</i> larvae	88 \pm 4 ^{ab}
IP-2	<i>Plodia interpunctella</i> larvae	100 \pm 0 ^a
IEp	<i>Ephestia kuehniella</i> larvae	100 \pm 0 ^a
DCf	Agricultural field (Cauliflower)	87 \pm 7 ^{ab}
MCh	Fruit garden (Cherry)	67 \pm 12 ^{bc}

* Different letters within each column represent statistical significant differences (P-value<0.05) among the Bt strains.

For further studies, five Bt strains (IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp) with two pyramidal crystals and two Bt strains of KhF belonging to the moderate toxicity group (42% \pm 2 of mortality) and RM of a group with low toxicity (0% \pm 0% mortality), which produce spherical and irregular crystals, respectively, were selected and studied in more detail. The reason for choosing two strains of KhF and RM was to compare the characteristics of these Bt strains with the most toxic ones.

The primary screening results of Iranian Bt strains showed that the majority of the studied Bt strains were not highly toxic for *P. interpunctella* larvae. Only 7 out of 130 Bt strains were found highly toxic for second instar larvae of Indian meal moth. Previous studies have shown the susceptibility of *P. interpunctella* larvae to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1I, Cry2A, Cry9, Cry39 and Cry49 proteins (Gryspeirt and Gregoire 2012; Shojaaddini et al., 2012). The estimated LC₅₀ value for AzLp is 2×10^6 spore/ml or spores/gram of artificial diet, this is the same as the calculated LC₅₀ for the spore and crystal mixture of Bt SY49.1 strain, 147.33 µg/g, equivalent to 2×10^6 spores per gram against *P. interpunctella* larvae (Yilmaz et al., 2012).

The aim of the first chapter of this thesis was to characterize Iranian Bt strains with diverse larvicidal potential against *P. interpunctella* larvae, based on protein profiles, gene content (*cry*, *cyt*, *vip*, *sip* and *ps* genes), the crystal protein composition, the spectrum of insecticidal activity, cytotoxic activity, and β-exotoxin production were extensively investigated. The studies were conducted on seven Bt strains of IE-1, AzLp, IE-2, IP-2, IEp, KhF and RM.

2.3.3. COMPARISON OF PROTEIN PROFILE OF Bt STRAINS

The protein patterns of the parasporal crystals of the different Bt strains were compared after SDS-PAGE analysis. Similar profiles were found among these strains, composed of proteins with molecular weights between 130 and 20 kDa. The protein compositions resembled that of Bt subsp. *kurstaki* (HD-1) and consisted of two major bands of 130 and 60 kDa. It has previously been shown that the standard strain of HD1 produces Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa proteins (Schnepf et al., 1998). The combination of these proteins explains the observation of the original two 130 kDa (corresponding to Cry1 proteins) and 65 kDa (consistent with Cry2 proteins). Also, the observation of other bands between the two original bands of 130 and 60 kDa was part of the protein in question due to proteolysis. Similar to the HD1 reference strain, in the test strains, a band of 130 kDa was observed, which could be compatible with Cry1, Cry7, Cry8 and Cry9 proteins (Arrieta et al., 2004). The proteins found in IE-1, IP-2 and IEp strains had a 65 to 75 kDa

band, possibly corresponding to the Cry2, Cry3, and Cry22 proteins (Fig. 2-4, Figure A). After solubilization, proteins were treated with 10% trypsin (w/w). Activated toxins profiles shown in the figure 2.4 panel B, were almost identical for all strains and showed two major bands of almost 65 kDa.

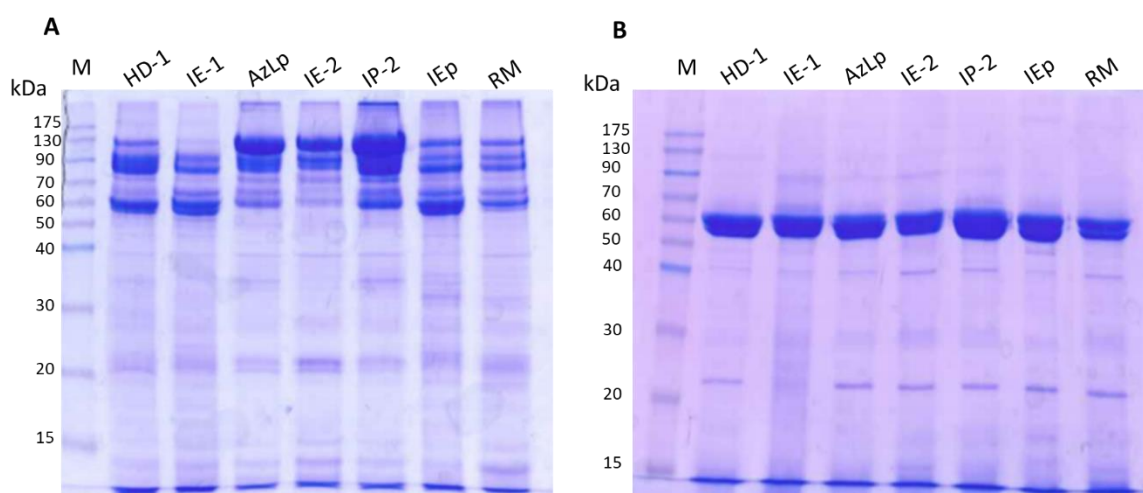


Fig. 2. 4. SDS-PAGE analysis of solubilized crystal proteins. A; Protoxins, B; trypsin activated proteins. The names of the different Bt strains are indicated in the top of each lane. MMW markers (Prestained protein ladder, Nippon Genetics), HD1 reference strain Bt HD1.

2.3.4. DETERMINATION OF CRYSTAL PROTEIN COMPOSITION OF Bt STRAINS BY LC-MS/MS

The insecticidal crystal proteins produced by each one of the Bt strains were analyzed by LC-MS/MS. Results with the confidence of identification of at least 95% were considered significant. Redundant proteins obtained in analysis were omitted, but proteins with high ProtScore values and proteins with several discriminating, distinct and specific peptides, were recorded. These selected proteins were further validated by using Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Following these criteria, the final analysis showed that Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da and Cry2Aa proteins were present in the solubilized crystal protein mixtures of each one of the selected Bt strains (Table 2.9). The Cry1A family proteins were the most abundant insecticidal crystal

proteins according to quantitative values. Cry1Ac was the only protein assigned to RM strain. For KhF strain, no protein corresponding to Bt insecticidal crystal proteins were identified. It could be possible that, either the insecticidal crystal proteins in KhF Bt strains were under the detectable level of Paragon algorithms employed by proteomics facility of the SCSIE at the University of Valencia or the KhF parasporal crystals does not contain insecticidal crystal proteins.

False-positive identification of Cry1Ag and Cry1H was obtained based on proteomics results. Due to the Cry1A proteins have a high degree of homology (Crickmore et al., 1998), the Cry1Ag and Cry1H proteins were identified through two and multiple peptides, respectively. In the case of Cry1Ag, two peptide sequences were specific for *cry1Ag* gene (when translated to nucleotide) and showed 100% identity with Cry1Ag protein. The alignment of all Cry1A-type genes shows high sequence similarity, and *cry1Aa* and *cry1Ag* genes, have a 97% identity. Moreover, alignment of Cry1Aa protein with Cry1Ag peptide sequences identified by proteomics in the present work, showed only one single amino acid substitution in C-terminal of Cry1Ag protein. Therefore, distinguishing Cry1Ag from Cry1Aa with LC-MS/MS results was almost impossible. On the other hand, *cry1Ag* gene was not detected with PCR, although expected size bands were observed but analysis with different restriction enzymes and sequences of PCR products indicated that there is no *cry1Ag* gene in the tested strain. Studying of Cry1H multiple peptides via TBLASTN showed that these peptides were not specific for *cry1H* gene. Besides Cry1H positive strains did not amplify any product with universal and specific primers for *cry1Ha* and *cry1Hb* genes. It is noteworthy that no known proteins of known crystalline biosynthesis were found in the crystalline cellulose of KhF. One of the disadvantages of detecting the crystalline protein content of the LC-MS/MS method used in this paper is that the probability of detecting new proteins is very low. Because the Protein Pilot v 4.5 (ABSciex) software helps the NCBI database to detect peptides, the only known proteins that are listed in NCBI or UniProt (Sequence Database) Protein) is detected and, if there are new ones, information about those proteins is lost.

Table 2. 9. Pesticidal crystal proteins identified by LC-MS/MS analysis

Isolate	N ¹	Unused ²	Coverage% ³	Accession	Name	Peptides (95%)	N* ⁴
IE-1	1	418.24	89.3	sp P05068	Cry1Ac	1237	522
	2	117.09	85.2	sp P0A368	Cry1Aa	1038	123
	3	74.5	71.56	sp P0A377	Cry2Aa	205	81
AzLp	1	303.97	83.46	sp P0A372	Cry1Ab	572	357
	2	156.25	74.43	sp P0A376	Cry1Ca	332	154
	4	58.62	82.57	sp P0A367	Cry1Aa	505	71
	24	19.26	37.6	sp P19415	Cry1Da	162	19
	45	10.34	73.26	sp P05068	Cry1Ac	394	7
IE-2	1	132.98	66.36	gi 757772063	Cry1Ca	714	92
	2	88.92	62.5	gi 757747932	Cry1Aa	695	61
	3	54.72	57.17	gi 757772066	Cry1Da	67	33
IP-2	1	370.36	87.88	sp P0A372	Cry1Ab	965	433
	2	183.02	74.18	sp P0A375	Cry1Ca	619	178
	3	109.98	72.88	sp P19415	Cry1Da	425	81
	4	73.1	85.46	sp P0A367	Cry1Aa	877	78
IEp	1	457.69	90.66	sp P05068	Cry1Ac	1249	540
	2	93.02	79.62	sp P0A377	Cry2Aa	256	105
RM	1	337.53	75.21	sp P05068	Cry1Ac	494	360

1: The rank of the specified protein relative to all other detected proteins.

2: ProtScore; A measure of the protein confidence for a detected protein, calculated from the peptide confidence for peptides from spectra that are not already completely used by higher scoring winning proteins.

3: The percentage of matching amino acids from identified peptides having confidence greater than 0 divided by the total number of amino acids in the sequence.

4: The number of peptide with the contribution value more than zero.

The content of Cry protein identified after analysis of LC-MS/MS results showed that two strains causing 100% mortality of second-instar *P. interpunctella* larvae were IP-2 and IEp, completely different protein content they had. The comparison between the results of biomass and proteomics showed that not only the protein content of Bt strain crystals, but also the relative frequency of proteins present in crystals, is also important in the toxicity of Bt strains. A justifiable reason to prove this claim is to compare the protein content and the toxicity of IE-1, RM, and IEp Bt strains. These three strains have similar protein profiles, but have a different toxicity against *P. interpunctella* larvae.

2.3.5. DETERMINATION OF GENE CONTENT

PCR analysis was carried out to identify genes encoding proteins, secreted during vegetative step of Bt such as; *cryII*, *vip* and *sip*. Also, determination of *cry*, *cyt* and *ps* genes were performed. Excluding KhF, the other strains yielded the expected amplicons for *cryI* genes. Positive amplification of *cry2* gene was observed in all tested strains. Strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp showed positive amplification of predicted band size for *cryIAc*, *cryII*, *vip3* genes. The *cryIAa* gene was present in IE-1, AzLp, IE-2 and IP-2. Two genes of *cryIC* and *cryID* were found in three strains: AzLp, IE-2 and IP-2. However, no *cryIAd*, *cryIAg*, *cryIG*, *cryIH*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1*, *vip2*, *sip1*, *ps1*, *ps2*, *ps3* and *ps4* genes were not replicated in any of the studied strains (Table 2-10).

In many studies on the identification and characterization of Bt strains, polymerase chain reaction methods were used to determine the gene content and predict the insecticidal activity of the studied Bt strains (Juárez-Pérez et al., 1997; Ferrandis et al., 1999). However, this accurate and fast technique is not able to show the expression level of the identified genes. Consequently, in this research, proteomics studies were used to complete the results of gene content determination.

Table 2. 10. Distribution of cry, cyt, vip, sip and ps genes in Bt strains, examined by PCR (sign + signifies the presence of the gene and the sign – shows the absence of the gene).

Genes	KhF	RM	IEp	IP-2	IE-2	AzLp	IE-1
<i>cryI</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>cryIAa</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>cryIAb</i>	-	-	-	+	-	+	-
<i>cryIAc</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>cryIAd</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cryIAg</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cryIC</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>cryID</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>cryIG</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cryIH</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cryII</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>cry2</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>cyt1-2</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>vip1-2</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>vip3</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>sip1</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ps1-4</i>	-	-	-	-	-	-	-

In general, the proteomic analysis and PCR results were consistent in the sense that when a protein was detected in a strain, the corresponding gene was detected by PCR. This correspondence did not always happen in the opposite direction. Indeed, the *cry2* gene was amplified in all tested strains but the protein was only detected in IE-1 and IEp. Also the *cryIAc* gene was detected in IE-2 and IP-2 but the protein was not detected in the LC–MS/MS analyses. This could be explained by a low transcription rate of the gene for diverse reasons, or due to the presence of defective un-transcribed sequences. In

conclusion, the PCR analyses, widely used in Bt screenings, can be useful solely to predict the proteins that may compose the Bt crystal. Genes of the cry1 family were found in all strains, excluding KhF, in accordance with the presence of the major band of about 130 kDa in SDS-PAGE and with the proteomic analyses. In the previous reports (Uribe et al. 2003; Thammasittirong and Attathom 2008), *cry1G* was considered as an abundant gene in the Bt collections, contrarily to our results. On the other hand, in the Chinese (Wang et al. 2003) and Iranian (Seifinejad et al. 2008) Bt collection, *cry1G* and *cry1H* were found rarely in agreement with our results. Therefore, the presence of these genes could be related with the origin of the strains. In the present work, the *cry2* gene was detected in all strains, in agreement with several studies that report the high frequency of *cry2* genes, especially among *cry1* containing strains (Porcar and Juárez-Pérez 2003; Seifinejad et al. 2008). Regarding *vip* and *sip* genes, the frequencies found in this and other screening studies differ or not depending on the origin of the samples analyzed (Salehi Jouzani et al. 2008; Seifinejad et al. 2008; Hernandez-Rodriguez et al. 2009; Djenane et al. 2017).

2.3.6. EVALUATION OF THE INSECTICIDAL ACTIVITY SPECTRUM OF Bt STRAINS

A bioassay screening at a single concentration was performed for these seven selected strains to detect any toxic activity of Bt protoxin and/or trypsin activated toxin against different larvae within the Lepidoptera order, including *S. exigua*, *G. molesta*, *M. brassicae* and *O. nubilalis*. Two species *G. molesta* and *O. nubilalis* were the most susceptible insects to protoxins and trypsin activated toxins. Various degrees of mortality were found in *S. exigua* and *M. brassicae* neonates treated with the selected strains. Among those, AzLp, IE-2 and IP-2 protoxins and activated toxins, exhibited highest levels of toxicity for *S. exigua* and *M. brassicae* compared to that of the reference strain, HD-1. Moreover, HD-1 and IE-1 trypsin activated toxins caused higher mortality on *M. brassicae* neonates compare to protoxins of these strains. Neither toxic activity nor growth inhibition was observed for KhF protoxins. Trypsinized proteins of this strain were not analyzed since it was not possible to solubilize the KhF crystals. The mortality obtained from toxin and protoxin of reference Bt strain, HD-1, at the tested concentration,

was more than 95% for *G. molesta* and *O. nubilalis* but for *S. exigua* and *M. brassicae* the highest mortality was in the range of 50 to 90% (Table 2.11).

Table 2. 11. Insecticidal activity of the seven selected Bt Iranian strains, and the reference strain HD-1. The values written in the table are the mean of percentage of mortality \pm standard error.

Strain	Protoxin (1000 ng/cm ²)				Trypsin activated (1000 ng/cm ²)			
	<i>S. exigua</i>	<i>G. molesta</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>M. brassicae</i>	<i>S. exigua</i>	<i>G. molesta</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>M. brassicae</i>
HD1	6 \pm 4 ^{c*}	99 \pm 1 ^a	100 \pm 0 ^a	38 \pm 13 ^b	10 \pm 5 ^c	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	60 \pm 11 ^{ab}
IE-1	56 \pm 7 ^b	99 \pm 1 ^a	94 \pm 6 ^a	8 \pm 2 ^c	48 \pm 8 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	41 \pm 17 ^{bc}
AzLp	99 \pm 1 ^a	99 \pm 1 ^a	98 \pm 2 ^a	94 \pm 4 ^a	97 \pm 3 ^a	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a
IE-2	95 \pm 4 ^a	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	79 \pm 13 ^a	96 \pm 4 ^a	100 \pm 0	86 \pm 7 ^a	82 \pm 17 ^{ab}
IP-2	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	97 \pm 2 ^a	98 \pm 0 ^a	100 \pm 0	98 \pm 2 ^a	100 \pm 0 ^a
IEp	41 \pm 11 ^b	100 \pm 0 ^a	92 \pm 2 ^a	22 \pm 7 ^{bc}	55 \pm 3 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	24 \pm 14 ^{bc}
RM	20 \pm 9 ^{bc}	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	8 \pm 6 ^c	42 \pm 10 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	29 \pm 9 ^{bc}
KhF	2 \pm 2 ^c	25 \pm 3.5 ^b	2 \pm 2 ^b	4 \pm 2 ^c	-**	-	-	-
ANOVA statistics								
F-value	47.8	383.8	139.4	44.1	33.3	-	3.1	7.6
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	0.038	0.0009

Values represent the mean of the percentages of mortality \pm SE. Statistics of one-way ANOVA analysis for each column data are included, and the analyses which rendered P values lower than 0.05 were followed by Tukey test. Different letters within each column represent statistical significant differences (Tukey test P-value<0.05) among the Bt strains used. Sign – indicates not analyzed.

The toxicity spectrum of second series of bioassays was restricted to four different lepidopteran families, namely Noctuidae, Tortricidae, Crambidae and Pyralidae. As a result, three Bt strains, AzLp, IE-2 and IP-2, showed higher toxicity against *S. exigua* and *M. brassicae* neonates than the standard HD1 (Table 2.11). This was in accordance with the loss of viability observed in the UCR-SE cells exposed to the activated toxins of AzLp, IE-2 and IP-2 strains. The toxicity of these strains on *S. exigua* could be due to the presence of Cry1C and Cry1D proteins (Hernández-Martínez et al. 2008). *M. brassicae* neonates are susceptible to Cry1C (Gilliland et al. 2002), and accordingly, the highest mortality was recorded in the Cry1C protein producers, AzLp, IE-2 and IP-2 strains (Tables 1 and 2).

G. molesta was the most susceptible insect in this study, due to the high toxic effect of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C proteins against this pest (Scaramal Ricietto et al. 2016). As reported in other studies (Hernández-Martínez et al. 2008) Cry1Ac is not toxic for *S. exigua*, which would be in agreement with the absence of toxicity exhibited by RM, a strain that following our proteomics and PCR results only possesses and express *cry1Ac* gene. There are several studies that report susceptibility of *O. nubilalis* to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Ie2, Cry9Ca and Cry9E (van Frankenhuyzen 2009; Zhae et al. 2015). Regarding the presence of Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac in the Bt strains studied, high susceptibility of *O. nubilalis* was expected and indeed observed (Table 2.11).

2.3.7 EVALUATION THE CYTOCIDAL ACTIVITY OF Bt STRAINS

The cytotoxicity spectrum of selected Bt strains was studied against four lepidopteran cell lines in terms of loss of cell viability. The result of single-dose assay showed no statistically significant difference between cytotoxic activity of HD-1 solubilized and trypsinized proteins, against all tested insect cells (Figure 2.5). IE-1 and RM Bt strains were the least toxic for all the tested cell lines, as the reference strain HD-1. The susceptibility of all the cells toward the solubilized proteins of IEp was statistically

similar, while IEp active toxins were specifically toxic for Hi5 cells, causing 84% of loss of viability. Solubilized and trypsinized proteins of AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains were highly cytotoxic for Sf21, Hi5, UCR-SE and HzGUT cell lines. Indeed, after 16 hours exposure to AzLp, IE-2 and IP-2 protoxins and toxins, no Sf21 viable cells could be observed.

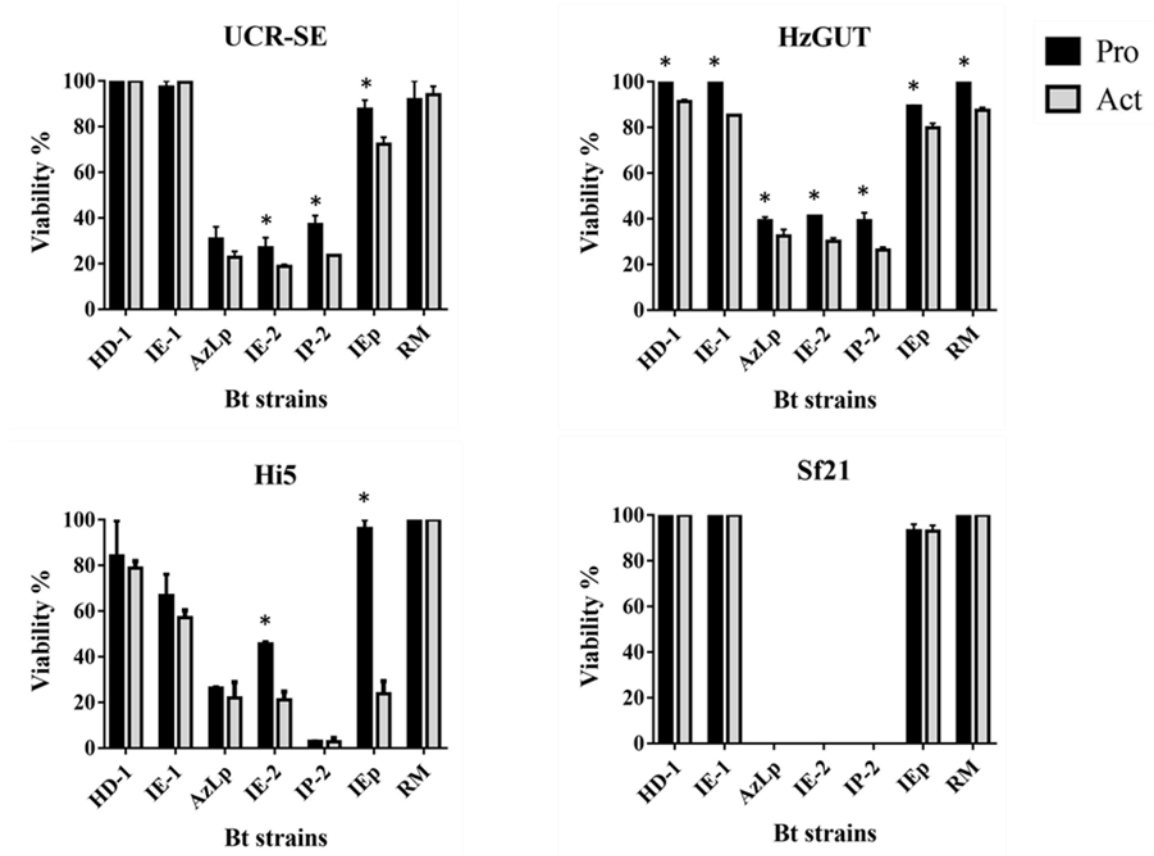


Fig. 2. 5. Susceptibility of UCR-SE, HzGUT, Hi5 and Sf21 cells to protoxins (Pro) and trypsin activated proteins (Act) from the different Bt strains. Bars represent percentages of viability after 16 h of exposure to 1 mg/ml of protoxins or 0.7 mg/ml of activated toxins. SE of the results from three different experiments were represented in each bar. (*) Statistically significant differences between protoxin and activated protein treatments (t test): in HzGUT cell line; HD-1 ($t = 18.6$, $df = 4$, $P < 0.0001$), IE-1 ($t = 254.6$, $df = 4$, $P < 0.0001$), AzLp ($t = 3.4$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0268$), IE-2 ($t = 12.7$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0002$), IP-2 ($t = 6.0$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0039$), IEp ($t = 8.6$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0010$) and RM ($t = 18.0$, $df = 4$, $P < 0.0001$). In UCR-SE cell line; IE-2 ($t = 3.1$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0350$), IP-2 ($t = 5.8$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0044$) and IEp ($t = 5.4$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0057$). In Hi5 cell line; IE-2 ($t = 11.2$, $df = 4$, $P\text{-value} = 0.0004$) and IEp ($t = 18.7$, $df = 4$, $P\text{-value} < 0.0001$).

Sf21 cell line was employed for further investigation due to its high susceptibility to Bt toxins. Figure 3 shows the result of dose-response assay with trypsin activated proteins of AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains. Three hours after treating the Sf21 cells with 16 $\mu\text{g/ml}$ of activated toxin (mid-concentration), osmotic swelling and balloon-shaped cells were observed (Fig 2.7). After one hour exposing to highest concentration of AzLp active toxin (400 $\mu\text{g/ml}$), swelling cells were detected and after 6 hours, lysed cells were observed. Viability of Sf21 cells decreased with the increase of trypsin activated toxin concentration. AzLp and IP-2 Bt strains exhibited a similar cytotoxic activity, following the same trend statistically different from IE-2 slope (-1.45 ± 0.26). After 6 hours exposure to 400 $\mu\text{g/ml}$ of active toxins of AzLp, IE-2 and IP-2, the number of Sf21 viable cells reduced to less than 10%. There was no statistically significant difference between EC_{50} values of AzLp and IP-2, 1.35 and 1.12 $\mu\text{g/ml}$ respectively (Table 2.12), but the EC_{50} of IE-2 strain was significantly lower (0.73 $\mu\text{g/ml}$).

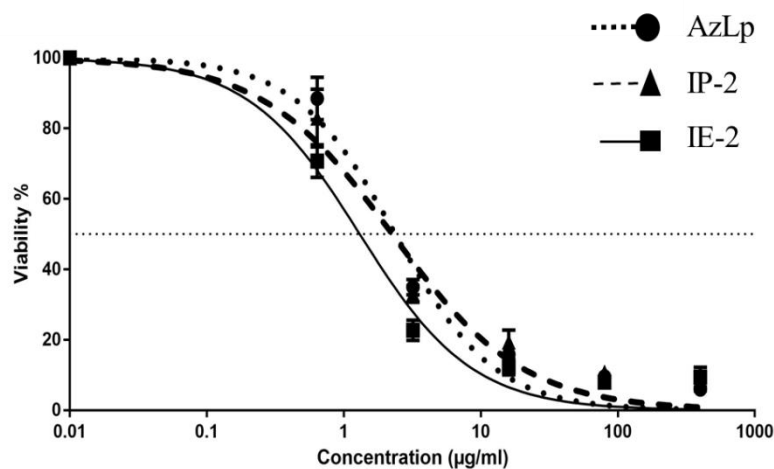


Fig. 2. 6. Dose-response curves of Sf21 cell viability exposed to different concentrations of AzLp, IE-2 and IP-2 activated toxins

Table 2. 12. Effective concentration of trypsin activated proteins from AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains against Sf21 cells.

Bt strains	EC ₅₀ (µg/ml)	95% confidence Interval	Slope ± SE
AzLp	1.89	1.50-2.36	-1.67 ± 0.22
IE-2	1.03	0.84-1.27	-1.53 ± 0.18
IP-2	1.60	1.14-2.23	-1.46 ± 0.24

The results of the microscopic observation show that after the Sf21 cells were subjected to intermediate concentrations of toxin (16 µg/ml) for three hours, the cells that were osmotic, balloon-shaped and swollen cells appeared. When cells were exposed to the highest concentration of toxin, 400 µg/ml, complete lysed cells were observed and recorded (Fig. 2-7).

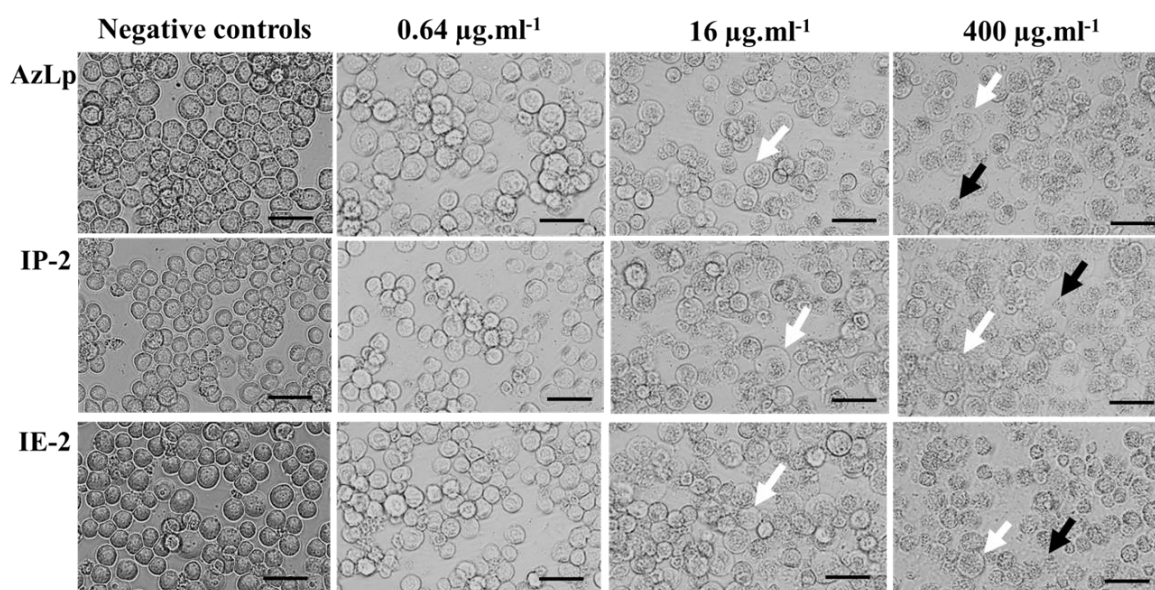


Fig. 2. 7. Sf21 cells treated with activated toxin of AzLp, IE-2 and IP-2 strains. The morphological changes were recorded three hours after the cells were exposed to toxin, at 0.64, 0.6, and 400 µg/ml concentrations. The white arrow points to swollen and balloon-shaped cells. The black arrow shows the damaged cells. The scale in the image is 50 micrometers.

To expand our knowledge of the insecticidal activities of the selected strains, *H. zea*, *T. ni*, *S. exigua* and *S. frugiperda*, cell lines were used. It has been discussed that the response of cell lines to different Bt toxins is not necessarily correlated with the in vivo activity toward the insect from which the cells are derived (Witt et al. 1986). To test this, the toxicity of our Bt strains towards *S. exigua* neonates and the *S. exigua* cell line UCR-Se was assessed and compared. Our results showed high correlation between bioassays and cell viability assays, pointing to the feasibility of using insect cell lines for toxicity screening.

In this study, the cell viability assays indicated that the crystal proteins from AzLp, IE-2 and IP-2 (the three most toxic strains in bioassays) were highly toxic for *H. zea*, *T. ni*, *S. exigua* and *S. frugiperda* cells. This is in accordance to what has been described for Sf21 and Hi5 cells lines, highly susceptible to Cry1C toxins (Kwa et al. 1998; Gringorten et al. 1999). According to our cell viability assay, Sf21, UCR-SE, Hi5 and HzGUT were not susceptible to IE-1 and RM, strains that mainly produced Cry1Ac protein. This is in agreement with Gringorten et al. (1999) and Chen et al. (2015) that reported no susceptibility for Sf9, Sf21 and Hi5 cells to Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac proteins. Cry1Ac and Cry1F are toxic for heliothines (Siebert et al. 2008), in contrast to our cell viability assays, that showed low susceptibility of HzGUT to IE-1, IEp and RM strains, in which the cry1Ac gene was expressed.

2.3.8. EXAMINATION OF β -EXOTOXIN PRODUCTION

As the last step of the characterization of Iranian Bt strains, the presence or absence of beta-exotoxin was determined by LC-MS/MS. In this test, the standard beta-exotoxin (type I) was obtained from strain of *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 (Berliner). Two strains of HD-2 and *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* VMA10.30 were used as positive controls and for negative control, the HD-1 strain was employed. The results indicated that none of the seven studied Bt strains, like the negative control (HD1), produce beta-exotoxin (Table 2-13). Determination of the production of beta-exotoxin is an essential and essential step before introducing a Bt strain for commercial use.

Table 2. 13. Determination of beta-exotoxin production in Bt strains.

Sample type	Sample text	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Standard β -exotoxin	12.5 $\mu\text{g/ml}$	13.8707
	25 $\mu\text{g/ml}$	23.2155
	50 $\mu\text{g/ml}$	45.7588
	100 $\mu\text{g/ml}$	104.6550
Negative control	HD-1	0
Positive control	HD-2	19.7885
	VMA10.30	15.8343
Bt strains	IE-1	0
	AzLp	0
	IE-2	0
	IP-2	0
	IEp	0
	RM	0
	KhF	0

In summary, to predict the insecticidal potency of newly isolated Bt strains, the LC/MS-MS analysis (which assess crystal protein composition) is a useful technique much more convenient than PCR-based characterization which can only offer a prediction of the proteins composing the crystal. But bioassays (with insects or with cell lines) are crucial and unavoidable steps to complete the strains characterization, since protein proportion and protein interaction between different toxins seem to be decisive for toxicity. As a result, due to the high toxicity towards different lepidopteran insect larvae and cell lines, the presence of the insecticidal proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Da, and the absence of β -exotoxin, AzLp, IE-2 and IP-2 Bt strains could be considered as important candidates for development of future Bt based insecticides.

In the second chapter of this thesis, we have tried to answer to another question. The question was raised: Is there a new and unique toxin among the newly identified Iranian native Bt strains? After the extensive studies that have been done on the gene content and

the crystal protein composition, is there any possibilities to find novel Bt genes? The answer to this question is presented in the next chapter.

CHAPTER THREE
SCREENING AND CLONING OF THE POSSIBLE NOVEL Bt
GENES

3.1. INTRODUCTION

Due to the use of Bt-based biological pesticides, resistance to a number of insect pests has been reported (Ferré et al., 1991). Different approaches have been taken to increase the efficiency of Bt products. To maximize the effect of Bt-based bio-insecticides and also to overcome resistance or at least to delay the resistance, application of several different Bt toxins (if possible with a different mode of action), in transgenic plants or in Bt products, seems appropriate. So far, many Bt genes have been identified, cloned and their insecticidal activity, have been investigated. In this chapter of the dissertation, the suitable genes for cloning were first determined based on the results obtained from identifying the protein content of the crystals and determining the gene content of the Bt strain. Then, due to the unique properties of CryII proteins, the study has been focused on the identification and cloning of the *cryII* gene.

A large number of CryII proteins have been identified and described so far, and their insecticidal activity has been evaluated against potentially susceptible pests, including *Spodoptera* spp., *Manduca sexta*, *Cydia pomonella*, *Agrotis ipsilon*, *Earias insulana*, *Plutella xylostella*, *Prays olea*, *Telchi licus licus*, *Bombyx mori*, *H. armigera*, *T. ni*, *Ostrinia* spp., *H. zea*, *Pyrrhalta aenescens*, *Leguminivora glycinivorella*, *Epiphyas postvittana*, *Artogeia rapae*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Anthonomus grandis* and *Tenebrio molitor* (Tailor et al., 1992; Koo et al., 1995; 1998; Choi et al., 2000; Tounsi et al., 2003; Song et al., 2003; Boncheva et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2006; Martins et al., 2007; Grossi-de-Sa et al., 2007; Guo et al., 2009; Dammak et al., 2010; Craveiro et al., 2010; Dammak et al., 2011; Guo et al., 2011; Bergamasco et al., 2013; Zhao et al., 2015; Shin et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018)

For the first time in 1992, Tailor and co-workers, found a new δ -endotoxin from Bt, which had unique features in terms of protoxin molecular weight, structure and range of insecticidal activity. The newly found gene was named *cryV* and cloned. The bioassay results of insecticidal activity of novel CryV protein showed that this protein was toxic for *L. decemlineata* and *O. nubilalis*.

In 2000, Choi et al., cloned *cryIIId1* gene. The sequences of amino acids derived from this gene were similar to those of Cry1Ia, Cry1Ib and Cry1Ic, 89.7, 87.2 and 83.4% respectively. Cry1Id1 toxin was toxic for *P. xylostella* larvae, but no significant insecticidal activity was observed on *B. mori* and *Agelastica coerulea* larvae.

The *cryIIe1* gene was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The effect of recombinant protein on different pests was investigated. Based on the results, Cry1Ie1 protein was toxic for *P. xylostella*, *O. furnacalis* and *L. glycinivorella*, whereas it had no insecticidal activity for *H. armigera*, *S. exigua* and *P. aenescens* (Song et al., 2003).

The effect of protoxin and activated toxin from Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Fa and Cry1Ia was investigated on *C. pomonella* larvae. The results showed that there was no significant difference between the toxicity of Cry1Ia protoxin and the activated toxin for *C. pomonella* larvae. While, for other studied proteins, the trypsin activated toxins were toxic at least 3 to 4 times higher than the protoxins. Also, Cry1Ia had the least toxicity for the tested pests comparing to other tested Cry proteins (Boncheva et al., 2006).

Another *cryII* gene with 2.2 kbp length namely *cryIIa7* gene has been cloned. The molecular weights of protoxin and activated toxin of Cry1Ia7 were calculated 80.9 and 60 kDa, respectively. The spectrum of insecticidal activity of Cry1Ia7 toxin was investigated against different insect pests from Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae families. Based on the results, Cry1Ia7 protein has been found toxic for pests including *L. botrana*, *P. xylostella*, *L. decemlineata* and *E. insulana*. The remarkable point about Cry1Ia7 toxin was that it did not compete with Cry1Ab and Cry1Ac toxins to bind to receptors on the surface of the midgut epithelial cells of *L. botrana* and *E. insulana* (Ruiz de Escudero et al., 2006).

The *cryIIa12* gene is isolated and cloned from the Bt S811 strain. The length of this gene is 2160 bp and encodes a protein of 719 amino acids, weighing 81 kDa. The sequence of amino acids of Cry1Ia12 protein is similar to other known proteins of Cry1Ia, up to 99%. The toxicity of Cry1Ia12 was tested against the most important pests of cotton, *S.*

frugiperda and *A. grandis*. The bioassay results showed that the recombinant protein has a moderate toxicity against the tested pests (Grossi-de-Sa et al., 2007).

The activity of the Cry1Ie protoxin, activated toxin (monomer) and oligomeric form was investigated on *P. xylostella* larvae. Based on bioassay results, LC₅₀ values were 14, 21 and 1400 µg/ml, for the protoxin, activated monomer and oligomer, respectively. As a result, the Cry1Ie protoxin has the most toxicity effect on *P. xylostella* larvae (Guo et al., 2009).

Two toxins of Cry1Aa11 and Cry1Ia11 were treated with midgut juice from *Prays oleae* larvae. The protoxin activation was investigated by using trypsin and chymotrypsin enzymes, as well as midgut intestinal extracts. Based on the results, the LC₅₀ value of Cry1Ia11 toxin was significantly higher than other two proteins which are different in terms of the mode of action (Damak et al., 2010) and insecticidal activity.

The effect of Cry1Ia10 toxin, alone and mixed with toxin Vip3Aa, was investigated on first instar larvae of *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* and *S. cosmioides*. Also, the interaction of these two toxins with binding sites on the midgut cells was studied. The results showed that the two Cry1Ia10 and Vip3Aa toxins did not compete for the same receptors in the epithelial cells, and they had a different mode of action. Bioassay results showed that Cry1Ia10 toxin had a lower toxicity for *S. frugiperda*, *S. albula*, and *S. cosmioides* than the Vip3Aa toxin, but the simultaneous use of both toxins, rendered a synergistic effect on *S. frugiperda*, *S. albula* and *S. cosmioides* larvae (Bergamasco et al., 2013).

The susceptibility of *H. armigera* larvae to transgenic maize expressing Cry1Ie and Cry1Ab toxins was studied. Cry1Ie toxin transgenic corn plants were considered toxic to *H. armigera* and *O. furnacalis* larvae, so that after six days, 50% of the larvae fed on the corn died. Although transgenic maize with Cry1Ab or Cry1Ac toxin had a higher rate of toxicity for *H. armigera* larvae than the Cry1Ie toxin, there was a lower toxic effect in Cry1Ac toxin resistant insects. Based on the results, the Cry1Ie protein has a different mode of action comparing to Cry1Ab and Cry1Ac proteins. Consequently, Cry1Ie toxin transgenic corn can delay the evolution of resistance in field insects (Zhang et al., 2013).

The potential use of Cry1Ie2 toxin at the same time with two other proteins, Cry1Ab and Cry1Fa, to control the *Ostrinia* spp. larvae was investigated. Protoxin and activated toxin of Cry1Ie2 weighed 81 and 55 kDa, respectively. Based on the results, the Cry1Ie2 protoxin has a high toxicity for *O. furnacalis* and *O. nubilalis* larvae. Also, the results of Zhao et al. (2015) have shown the possibility of simultaneous use of two toxins, Cry1Ie2 and Cry1Ab, to control the *Ostrinia* spp. larvae. Because the two proteins have different binding sites, they do not compete with the receptors in the midgut epithelial cells.

Based on the results obtained in the research of Oliveira et al. (2016), transgenic cotton with Cry1Ia12 toxin, has caused more than 40% mortality of *S. frugiperda* larvae, and the developmental period of these insects is up to 30 times higher than that insects fed on non-transgenic cotton. Also, *A. grandis* population is controlled by 60%. The larvae and adults of *A. grandis* insects fed on transgenic cotton are significantly smaller and weaker than insects fed on ordinary cotton. Based on the results obtained in this study, Cry1Ia12 toxin controls both *S. frugiperda* and *A. grandis*.

MATERIALS AND METHODS

3.1. FINDING A CANDIDATE GENE FOR CLONING

In this section of the dissertation, the goal was cloning a new gene and examining the effect of the protein produced by that gene on larvae and insect cells. To this end, first, we have focused on the results of proteomics analysis. Consequently, a list of candidate genes from identified proteins, and of new proteins that had not yet been investigated for their insecticidal activity, has been prepared. The genes related to the newly detected proteins were traced by PCR. The amplified fragments were sequenced and the sequence result was investigated in the NCBI database. However, it should be considered that all Bt genes are not expressed, so we will not have any information about the protein produced by these genes in the proteomics results. As a result, due to the protein profile

and the spectrum of insecticidal activity of Bt strains, the probability of the presence of some insecticidal genes was investigated by polymerase chain reaction.

The new proteins based on LC/MS-MS and PCR results, which had not yet been investigated, included Cry1Ag, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1G, Cry1Ad and Cry1Ia proteins.

3.1.1. *cryIAg* GENE

According to proteomics results, in IE-1 Bt strain, the Cry1Ag protein is present and, according to a review of the databases, the insecticidal activity of this protein has not yet been investigated. A list of all peptides identified for this protein (with a high confidence level of 95%) was provided. The prepared list contains 491 peptide sequences with a length of more than six amino acids, unique and without repeat. The peptide sequences were compared with the nucleotide and peptide sequences in the NCBI gene bank using software PBLAST and tBLASTn, respectively. The results of comparative alignment between nucleotide sequences and amino acids indicate that the studied peptide fragments were related to the Cry1Ag protein with accession number of Q9S515.1. The highest similarity was found with the *cryIAg* gene with accession number of AF081248.1. Then, after obtaining a complete nucleotide sequence of the *cryIAg* gene, with the accession number AF081248.1, specific primers were designed to amplify this gene. The *cryIAg* gene has 3859 bp and the CDS of this gene is from nucleotide number 159 to 3659. From the translation of this gene, a protein of 1166 amino acids is obtained. For complete amplification of this gene, four pairs primer, as described previously, were designed.

The amplified fragments in PCR, after removal of non-target components and remaining reagents by using the NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit, were sent to StabVida Company for sequencing. But no amplification for the first part of the gene was obtained with the first pairs of primer. Consequently, using the genome walking technique, the nucleotide sequence of the first part (upstream) of the *cryIAg* gene, which was not replicated by the primers, was identified.

The method of genome walking or DNA walking is a simple way to find the unknown sequence of genomic DNA that is flanking the known sequence. Thus, by using a fragment of the gene where its sequence is known, the sequence of a DNA or gene that is unknown or unidentified will be determined. In short, as shown in Fig. 3.1, the method of performing genome walking is as follows. Firstly, the genomic DNA of high quality, purity and high concentration has to be prepared. Different aliquots of DNA were prepared and each was completely digested using different restriction enzymes that produce a sticky end. Then, into two ends of the digested genomic DNA fragments, appropriate adapter was inserted. These genomic fragments with adapter inserted are called genomic libraries. After making these genomic libraries, it was necessary to carry out two nested PCRs, in which the second PCR was performed using the first PCR product. To perform these PCRs, two primers are needed, which used to amplify the upstream or downstream of our desired sequence. These primers are designed in reverse order or forward depending to the unknown region of the desired gene. The other pair of pairs are designed based on the sequence of adapters attached to the sticky end of the genomic DNA fragments. In the first PCR, Gene Specific Primer number 1 (GSP1) was used and in the second PCR, Gene Specific Primer number 2 (GSP2). Given that the upstream region of *cryIAg* gene is unknown, the GSP2 primer is closer to the unknown region of the gene and GSP1 primer is located far away from the unknown region. The original PCR product, initiated by the GSP1 primer, was used to carry out the second PCR with the GSP2 primer. Then the second PCR products were sequenced and the sequence of unknown *cryIAg* gene was obtained.

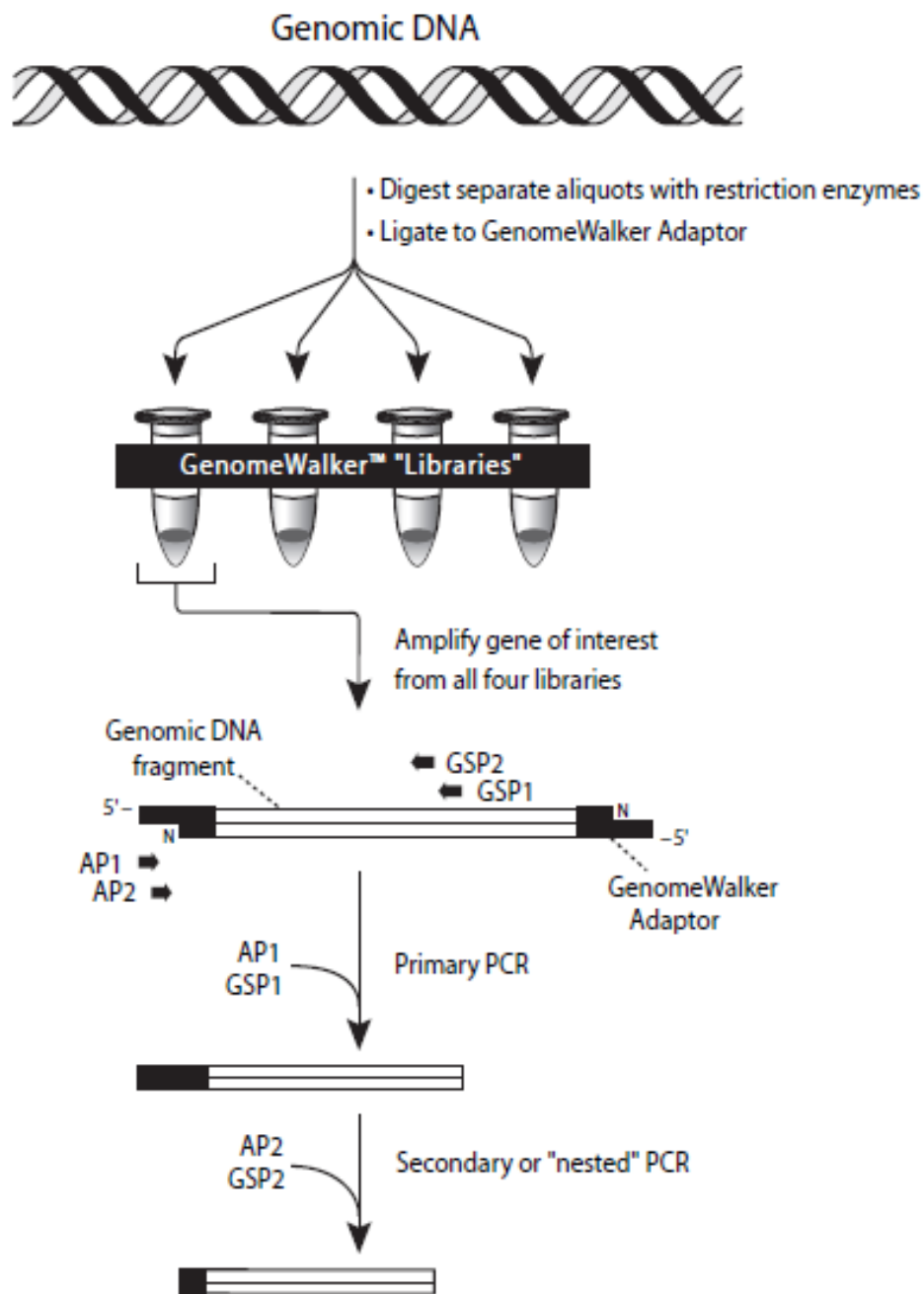


Fig. 3. 1. Different steps for performing the genome walking technique.

According to the explanation, in the first step, it was necessary to extract the IE-1 genomic DNA. To extract the DNA, Qiagen kit, DNeasy Blood & Tissue Kit (Hilden, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Then, the quantity and quality of DNA extracted was investigated using a Nanodrop instrument. To investigate the integrity of the extracted DNA, one microliter of the extracted DNA, plus 4 μ l of the sample buffer, was loaded in 1% ethidium bromide-agarose gel. The purity of the extracted DNA was investigated using *DraI* restriction enzyme. This enzyme has a recognition site of six nucleotides (TTTAAA) and produces blunt end. Thus, in a 0.5 mL micro-tube, five μ l of the desired DNA with a concentration of 0.1 μ g/ml, 1.6 μ l of the *DraI* enzyme (10 units / μ l), 10 μ l buffer (of *DraI* enzyme) and 11.4 μ l sterile distilled water was added. In the case of the negative control, sterile water was used instead of the enzyme. Micro-tubes were incubated at 37 ° C for two hours. Five μ l of the reaction mixture was loaded on a 1% agarose gel. At this step, it was expected that DNA extracted by the *DraI* restriction enzyme would be digested and smeared. In the next step, four restriction enzymes *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* and *StuI*, which produce blunt ends, were used to construct four genomic libraries.

To create genomic libraries, one micro-tube of 1.5 milliliters was used for each enzyme and the extracted DNA (25 μ l) at concentration of 0.1 μ g/ml, eight μ l of restriction enzyme (with concentration of 10 units/ μ l), 10 μ l 10x restriction enzyme buffer and 57 μ L sterile distilled water was added. Microtubes were incubated at 37 ° C for two hours, and then five μ l of each library was loaded on a 1% agarose gel to in order to investigate the DNA digestion. It was expected that in each digestion, the smear was seen in the sense that the enzyme has cut DNA in different positions. After digestion, the extracted DNA was purified by phenol-chloroform. In this way, 95 microliters of phenol were added to each micro-tube and the micro-tubes were vortexed at a very low speed between 5 and 10 seconds. After the formation of two phases, the aqueous phase (the supernatant) was carefully transferred to a new micro-tube. Then, 95 microliter chloroform were added to each micro-tube, the micro-tubes were vortexed at a very low speed between 5 and 10 seconds. After the formation of two phases, the blue phase (the supernatant) was carefully

transferred to a clean micro-tube. Then, 190 μl of cold 95% ethanol, 9.5 μl of 3 M NaOAc, were added to each tube, and the micro-tubes were vortexed at a very low speed between 5 and 10 seconds. The centrifugation was performed for 15 minutes at 4 ° C at 14000 rpm. The supernatants were discarded and the pellet was dissolved in 20 μl of TE buffer (10 / 0.1, pH 7.5), and then micro-tubes were vortexed at a very low speed between 5 and 10 seconds. The quality and quantity of one microliter from each genomic library were determined in a 1% agarose gel and a Nanodrop instrument, respectively. The Genome Walking Universal Kit (Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, California, USA) was used. The adapters of this kit were connected to the sticky ends of the gene fragments in each library, as shown in Figure 2.2. To prevent the formation of secondary structures and pins, it was necessary to connect the adapter to the blocker. Adapter and blocker were mixed at a 1: 1 ratio, and to avoid the formation of double-stranded DNA, the resulting mixture was heated at 99 ° C for one minute.

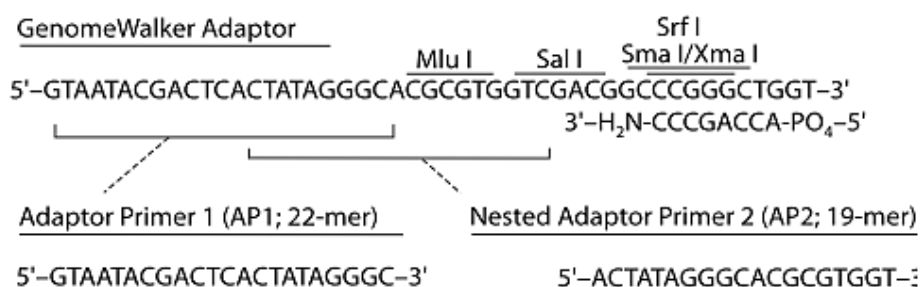


Fig. 3. 2. Adaptors and blockers used in genome walking technique.

In the next step, to insert the adapter to the gene fragments, to each genome library, a 0.5-millimeter micro-tubes was allocated and in which 7.5 microliter of digested and purified DNA, 10 microliters of adapter with a concentration of 25.5 μM /0.5 μL of T4 (Thermo scientific EL0014) with a concentration of five units per μl , and one μL of 10X binding buffer were added. The micro-tubes were incubated at 16 °C overnight. To stop the reaction, the micro-tubes were placed at 70 ° C for five minutes, and to each tube 72 μL of TE (1/10, pH 7.5) buffer was added and later the micro-tubes were vortexed at a very low

speed between 5 and 10 seconds. The two specific primers for *cryIAg* gene amplification called GSP1 and GSP2 were required for the first and second PCRs, respectively. For designing the primers in order to apply genome walking technique, certain conditions have to be considered:

- The length of these primers should be between 26 and 30 nucleotides, with an optimum of 27 nucleotides,
- 40 to 60% of GC content of the primers, even if the melting point will be very high,
- No secondary structure due to the large number of nucleotides,
- The 3' end of primer should not be attached to the 3'end of the adapter,
- The melting temperature of 67 °C has to be considered,
- In the last six nucleotides present at the end of the primer, there should not be more than three guanines and three cytosine.

Given these conditions, two specific primers were designed. As mentioned previously, the first part of *cryIAg* gene was unknown, therefore the upstream the gene has to be amplified. Thus the primers of the adapter (AP1 and AP2) were considered as forward primers and the designed primers were used as reverse. The reaction mixture was prepared for the first PCR as described in Table 3.1. KAPA HiFi hot start (KaPA Biosystems, Basel, Switzerland) was used to amplify the required regions.

Table 3. 1. Amounts and concentrations of consumed materials in the first PCR.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	10	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/µl	1	0.02 U/µl
dNTPs mix	10 mM	4	0.8 mM
Adaptor primer (forward)	10 µM	1	0.2 µM
GSP1 primer (reverse)	10 µM	1	0.2 µM
Template DNA	100 ng/µl	2	4 ng/µl
Sterile bidistilled water		31	
Total volume		50	

Touchdown PCR in two different stages, was used for performing the genome walking. In the sense that the PCR was started at a high melting temperature, then at each step, the temperature dropped to prevent non-specific binding. The conditions for the first PCR were described in Table 2.2. The products of the first PCR on a 1% agarose gel were examined.

Table 3. 2. PCR conditions for performing the first PCR in genome walking.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	70 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	63	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

It is expected that in the second PCR, bands of smaller size will be detected comparing to those of the first PCR. It means that the unknown part of the gene, which is located between GSP2 to AP2, was amplified. Therefore as discussed previously, GSP2 in comparison to GSP1, is located closer to the unknown part of the gene. Preparation of the reaction mixture for the second PCR, such as the first PCR, was performed except that instead of the gene library (DNA template), two µl of the original PCR products diluted 1:50 were used. The products of the first and second PCR were sequenced. The obtained sequences were edited with the Geneise software (version 10.0.9) and consensus sequences were obtained. The result of the consensus blast showed that the amplified

gene portion is related to *cryIAa* gene, not *cryIAG* gene. It seems that in PCR amplification of *cryIAG* gene, both *cryIAa1* and *cryIAG1* genes were multiplied simultaneously. Later, by using specific restriction enzymes for each gene, the presence of each genes was revealed. From Bt δ -endotoxin nomenclature website (<http://www.btnomenclature.info/>), the accession number of each of these genes, the resulting nucleotide sequence of the gene at the NCBI database were obtained. A list of restriction enzymes for each of these genes was prepared using the Clone Manager software. Then, considering that the restriction site of these enzymes is in the proper range of PCR products, in the sense that the bands obtained from the cut are visible on the gel, a list of specific restriction enzymes for each gene was prepared (Table 3.3). Selective restriction enzymes were the *SmaI* enzyme for the *cryIAa1* gene, and the *SacI* enzyme for the *cryIAG1* gene. The *SacI* enzyme cuts the *cryIAa1* gene at nucleotide 1869, whose nucleotide position is consistent with nucleotide number 1392 in the consensus sequence of IE-1, so if the *cryIAa1* gene in PCR is amplified and cut by the restriction enzyme, two pieces with a size of 524 and 669 bp would be expected. However, if the product is a *cryIAG1* gene, the result, after the *SmaI* enzyme cutting, would be two bands with gel sizes of 154 and 788 bp. The appropriate buffer was determined for the activity of each enzyme and optimal temperature according to the manufacturer's instructions. The pET30a vector was used to determine the accuracy of the restriction enzymes.

Table 3. 3.The list of specific restriction enzymes for each of the *cry1Aa1* and *cry1Ag1* genes.

<i>cry1Aa1</i> gene			<i>cry1Ag1</i> gene		
Enzyme	Number of cut	Restriction site	Enzyme	Number of cut	Restriction site
BanII	1	2693	BceAI	1	2020
BspM I	1	159	Cfr10 I	1	2507
BstAP I	1	415	Hpy99 I	1	3853
Ec1136 II	1	1869	PshA I	1	1610
HPa I	2	372 and 289	Sal I	1	3854
MscI	1	2038	Sma I	1	3005
PciI	1	176	Xma I	1	3005
SacI	1	1869			
SpeI	1	703			

3.1.2. *cry1Ha* AND *cry1Hb* GENES

The next candidate genes for cloning were *cry1Ha* and *cry1Hb*. These genes were selected based on the results of proteomics on IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp Bt strains. In IE-1 Bt strain, 12 peptide fragments with a length of more than six amino acids have been reported. The detected and selected peptides specifically matched with Cry1Hb protein with a high confidence level of 95%. PBLAST (protein-protein blasts) and TBLASTN (protein blast to nucleotides) were performed for these 12 peptides to ensure that the reported peptides are related to the Cry1Hb protein. The distribution of these 12 peptides along the protein and the *cry1Hb* gene was also studied.

In IP-2 Bt strain, the proteomics analysis resulted in 20 fragments of peptides with a length of more than six amino acids, which, with a high confidence level of 95%, specifically correlated with the Cry1Ha protein. Blast results indicated that these peptides are generally found at the N-terminal end of the identified protein, which is highly conserved among the Cry proteins, especially the Cry1 family. The result was that, based on the location of identified peptides for each protein, degenerate primers were designed to amplify the desired gene. Therefore, the first step was to align the identified peptides and the gene to determine the location of these peptides on the gene. Twelve peptides of the Cry1Hb protein are from the nucleotide 1300 to 3100 on the corresponding gene. In the case of the Cry1Ha protein present in the IP-2 strain, it was similar to the previous protein. First, the location of these peptides was investigated on the gene, and primers were designed. Information of the designed primers to amplify *cry1Hb* and *cry1Ha* genes is presented in Table 4-4. PCR products were sent to Stab Vida for sequencing.

Table 3. 4. Primers Designed for the amplification of *cry1Ha* and *cry1Hb* genes.

GC%	Product size (bp)	T _m (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
38.1	209	58.9	GGGAATTTAGAGTTTCTCGAA	<i>cry1Hb</i>	E1-Hb-F
38.9		58.8	ATGAATCATGGCGATGTT		E1-Hb-R
29.2	570	51.6	GATARATTAMAAGCGGATACGAAT	<i>cry1Ha</i>	P2-Ha-F
38.9		52.1	TTCATAGACTGACGCATA		P2-Ha-R
38.9		52.5	GCTTYCATANGYTTTCGTC		P2-Ha-R.deg

Y= C or T, R= A or G, M= C or G and N= any base.

3.1.3. *cry1G* GENE

The next gene candidate for cloning was the *cry1G* gene. In the proteomics results of IEp strain, Cry1G protein was reported. To design the universal *cry1G* gene primer, all Cry1

family holotypes were firstly aligned, and conserved blocks and variable regions in this gene family were identified. The 5' end of gene is variable, resulting in a design of primers from a variable region of the gene with other genes. Then, all family members of the *cry1G* gene, including *cry1Ga*, *cry1Gb* and *cry1Gc*, were aligned to design the specific primers for all members of Cry1G family. The reaction mixture and the thermal cycles of the polymerase chain reaction were prepared in accordance with Tables 3.5 and 3.6. PCR products were sent for sequencing and the received sequences were edited and the results were analyzed in the NCBI.

Table 3. 5. Amounts and concentrations of consumed materials for the amplification of the cry1G gene.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/µl	1	0.04 U/µl
dNTPs mix	10 mM	1	0.4 mM
Forward primer	10 µM	1	0.4 µM
Reverse primer	10 µM	1	0.4 µM
Template DNA	100 ng/µl	1	4 ng/µl
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

Table 3. 6. PCR conditions for amplification of cry1G gene.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	45	45 sec	35
Extension	72	90 sec	
Final extension	72	10 min	1

3.1.4. *cryIAd* GENE

Cry1Ad protein was reported in proteomics results of IE-1 Bt strain. As a result, the next candidate gene was the *cryIAd* gene. According to proteomics results, there were 29 specific peptides for this gene with a high confidence level of 95%. The location of these peptides was first specified in the *cryIAd* gene. Then, after alignment of all the genes of the *cryI* family a specific primer for this gene was designed. The remaining steps are similar to those described above.

3.1.5. *cryIIa* GENE

According to the results of gene content screening of Bt strains, *cryII* gene was amplified in five Bt strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp. The sequencing and blast results showed that the amplified gene fragment is related to *cryIIa* gene. The complete nucleotide sequence of the *cryIIa* gene in the NCBI gene bank is 2965 bp, with a nucleotide number 355 to 2514 relative to the coding sequences or CDS genes. Consequently, three pairs of primer were designed to amplify the entire 2160 nucleotide genes of *cryIIa* (Table 3.7). The reaction mixture is similar to the one described in Table 2-3. Thermal reaction of polymerase chain reaction was adjusted according to Table 3-8. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel.

Table 3. 7. The designed primers for amplification of cry1Ia gene.

GC%	(°C) T _m	Primer sequence (5' - 3')	Primer name	Primer number
39.2	61.1	AGAGCAACTTAATCAAGCAGAGA	Cry1I-33F	First pair of primers
36.4	62.1	TTGGGCTGTAGTTTAAATTGGA	Cry1I-1246R	
39.2	64.3	CGCATTAGAATTGATGTTCGTTTC	Cry1I-866F	Second pair of primers
39.2	63.1	TCCAAGCACCATTTGTGAATGTA	Cry1I-2253R	
34.8	63.1	TGAGCCAAATAGCATTACACAAA	Cry1I-1883F	Third pair of primers
38.1	63.5	TGATGAAAAGAAAAGCCCTCA	Cry1I-2957R	

The results of the polymerase chain reaction for the second and third pairs of primers were positive for all five strains, the first primer pairs could not amplify the 5' end of the gene. Using genome walking technique, as previously described for *cryIAg* gene, the whole *cryIIa* gene was amplified only in the IE-1 Bt strain. The nucleotide sequence of 1945 bp was determined from the gene, for amplification of the 5' end, it was necessary to move upstream of the gene, so the reverse primers of GSP1 and GSP2 were designed (Table 3-9). The spacing between the two reverse primers is 300 nucleotides. The reaction mixture and thermal conditions of the first and second PCRs were prepared according to tables 3.10, 3.11 and 3.12.

Table 3. 8. The primers used in *cryIIa* nested PCR.

$T_m(^{\circ}\text{C})$	Primer sequence (5'-3')	Target gene	Primer
71.7	TAGATTCAGCCCTGCCAATGATTCAGT	<i>cryIIa</i>	CryIIa-GSP1
67.5	AAGTCGTACTIONTGTAATAACTTGGATGCG		CryIIa-GSP2

Table 3. 9. PCR reaction mix.

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	10	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/ μl	1	0.02 U/ μl
dNTPs mix	10 mM	4	0.8 mM
Adaptor primer (forward)	10 μM	1	0.2 μM
GSP1 or GSP2 primer (reverse)	10 μM	1	0.2 μM
Template DNA	100 ng/ μl	2	4 ng/ μl
Sterile bidistilled water		31	
Total volume		50	

Table 3. 10. PCR conditions for first PCR in genome walking.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	72 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	65	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

Table 3. 11. PCR conditions for second PCR in genome walking.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	70 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	63	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

After revealing the first and second PCR products on a 1% agarose gel, the amplified fragments were sequenced and edited. As a result, the nucleotide sequence of the whole *cryIIa* gene was obtained. The obtained gene sequence was compared with the other

genes in the NCBI gene bank. Later, Bt δ -endotoxin Nomenclature Committee, named our novel Bt gene as *cryIIa38*.

3.1.6. CLONING OF *cryIIa38* GENE

Among the candidate genes, the *cryIIa* gene was selected for cloning. The complete sequence of the *cryIIa* gene, including the encoding region (CDS), as well as the untranslated regions of the 3' and 5' (3' and 5'UTR) termini, which is 3162 bp, was deposited in the gene bank NCBI. The accession number of *cryIIa38* in NCBI is MG584186. For *cryIIa38* gene cloning, firstly a cloning vector and then an expression vector were used.

3.2.6.1. SELECTING THE APPROPRIATE VECTOR

To clone *cryIIa38* gene, a T-cloning vector, pGEM-Teasy (Fig. 3.3), and a pET30a (+) expression vector (Fig. 3.4), were used. The pGEM-Teasy vectors are linearized vectors with a single 3'-terminal thymidine at both ends. The T-overhangs at the insertion site greatly improve the efficiency of ligation of PCR products by preventing re-circularization of the vector and providing a compatible overhang for PCR products generated by certain thermostable polymerases. The pGEM-Teasy vector contains T7 and SP6 RNA polymerase promoters flanking a multiple cloning region within the α -peptide coding region of the enzyme β -galactosidase. Insertional inactivation of the α -peptide allows identification of recombinants by blue/white screening on indicator plates. Therefore, due to the incorporation of the DNA fragment into the cloning region, the recombinant colonies in a medium containing the X-Gal-IPTG reagent were screened by blue/white detection.

The expression vector pET30a (+) is a 5421 bp plasmid with His-Tag and S-Tag sequences at the N-terminal, as well as the restriction sites for thrombin and enterokinase enzymes at the C-terminal.

After selection of the appropriate vectors, the restriction enzymes used in the cloning were determined. A list of restriction enzymes was prepared by using NEBcutter (Version 2.0) software and compared with the restriction site in the cloning and expression vectors (Figure 3-8). The selected restriction enzyme should not have the restriction site in *cryIIa38* gene. The result of this comparison showed that the three restriction enzymes *XhoI*, *HindIII*, and *NdeI* were shared between the vector and the fragment, hence the three enzymes were not used. The selected restriction enzymes, *BamHI*, and *SalI*, were used to clone *cryIIa38* gene.

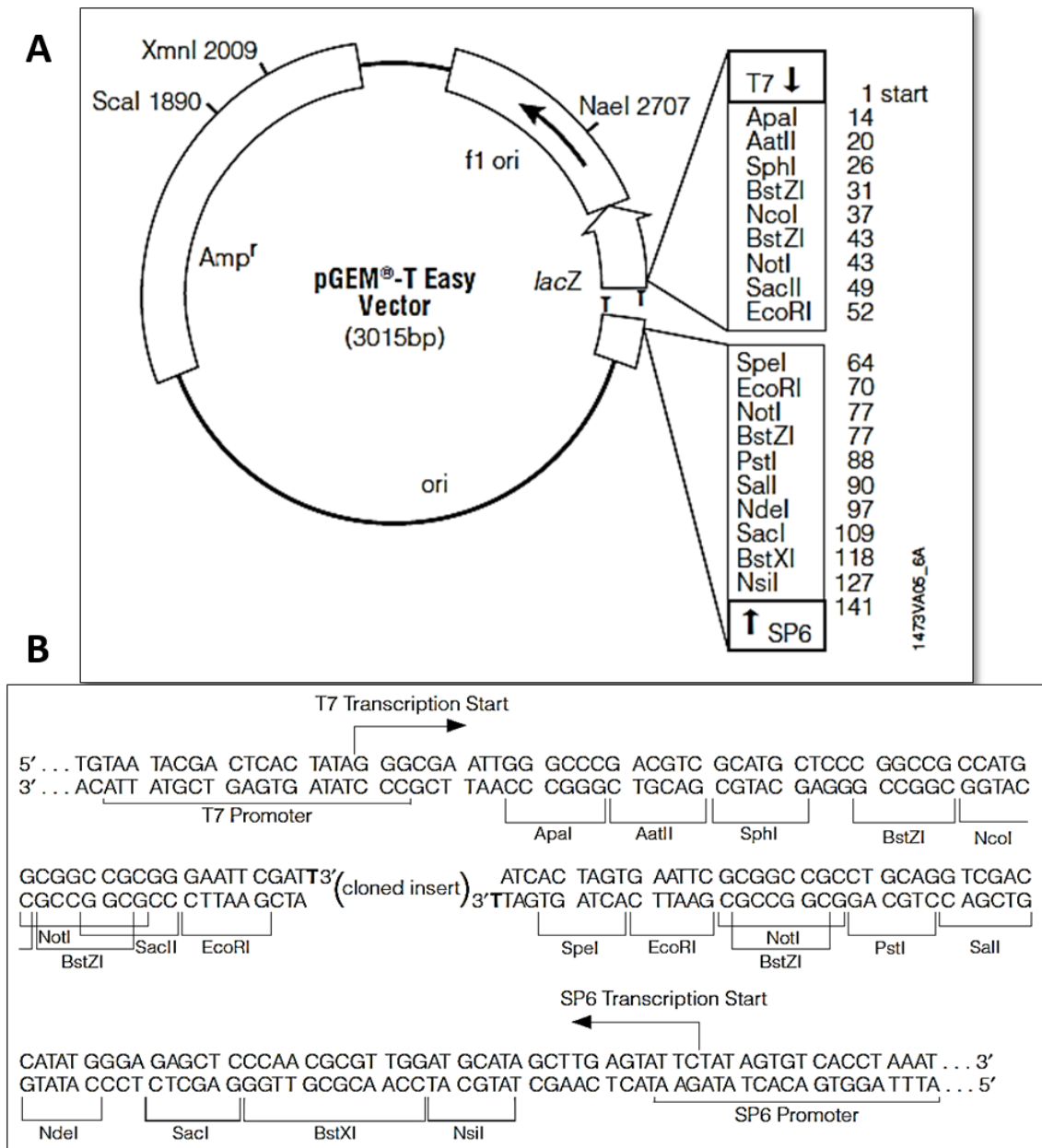


Fig. 3.3. The map of pGEM-Teasy vector (www.promega.com).

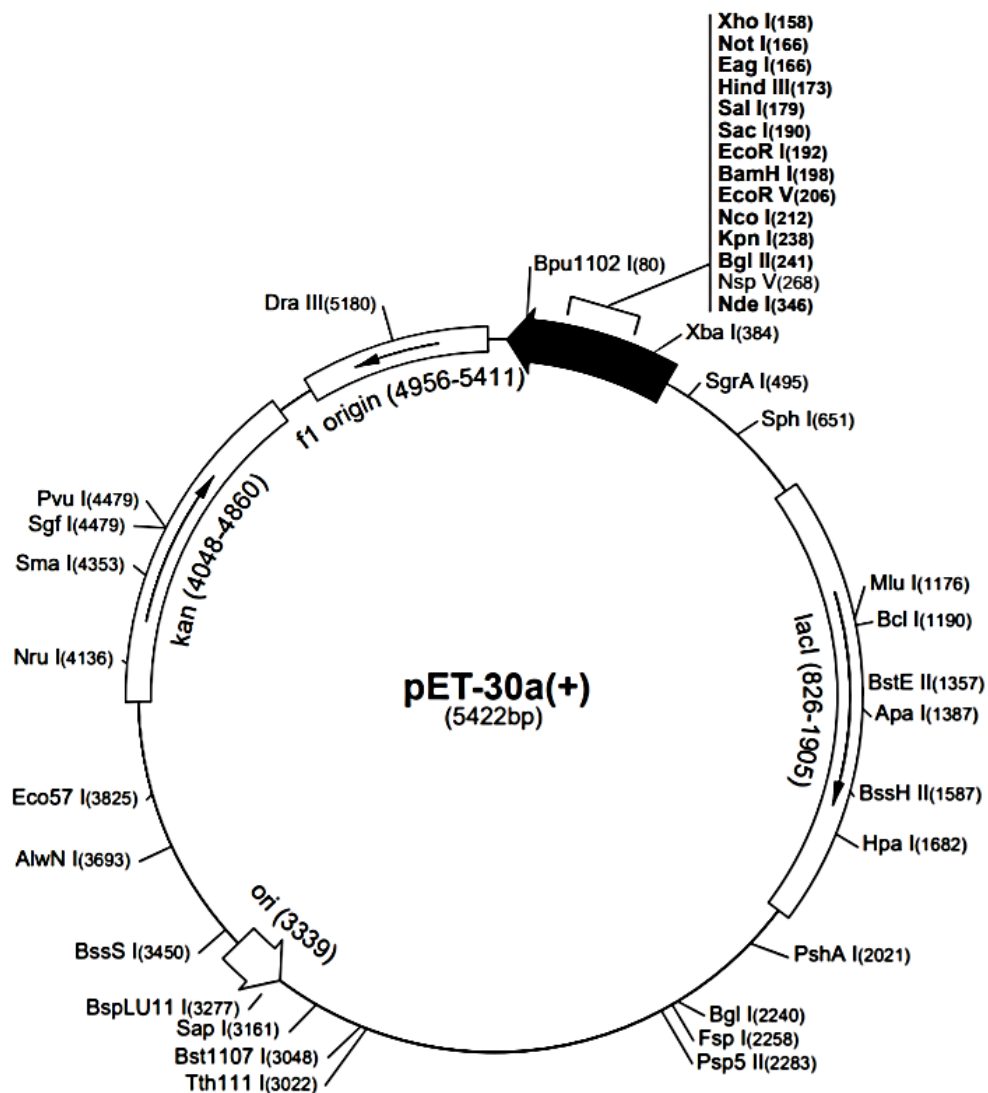


Fig. 3. 4. The map of pET-30a(+) vector (www.addgene.org).

Then, the compatibility of selected restriction enzymes for double digestion was investigated in NEBcutter software. After ensuring that the restriction enzymes are compatible, the restriction sites for the two enzymes Thrombin and Enterokinase was also investigated in the amino acid sequence of the protein derived from the *cryIIa38* gene. Before starting the cloning, all the steps of *cryIIa38* cloning in cloning and expression vectors were analyzed *in silico* by computer simulation by using two different softwares Clone Manager and SnapGene Viewer.

In order to amplify the *cryIIa38* gene for cloning, a pair of primers was designed considering the restriction sites for *Bam*HI and *Sal*I restriction enzymes at the 5' and 3' ends of the gene, respectively (Table 3- 13).

Table 3. 12. Primers used in the *cryIIa38* gene amplification for cloning.

GC%	T _m (°C)	Primer sequence* (5'-3')	Primer
33.4	64.2	<u>GGATCC</u> ATGAAACTAAAGAATCAAGAT	Ia38-F
44	64.8	<u>GTCGAC</u> CTACATGTTACGTTACGCTCAATC	Ia38-R

* The sections indicated in the upstream and downstream primers are related to the restriction position of the restriction enzymes.

To amplify only the coding region of the *cryIIa38* gene, 2100 bp, after designing the primers, the reaction mixture and the PCR conditions were set according to Tables 3-14 and 3-15.

Table 3. 13. The amounts and concentration of used materials for the complete amplification of *cryIIa38* gene by PCR.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	10	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/µl	1	0.02 U/µl
dNTPs mix	10 mM	2	0.4 mM
Forward primer	10 µM	1	0.2 µM
Reverse primer	10 µM	1	0.2 µM
Template DNA	100 ng/µl	2	4 ng/µl
Sterile bidistilled water		33	
Total volume		50	

Table 3. 14. PCR condition for amplification of cry1Ia38 gene.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	91	1 min	
Annealing	59	45 sec	35
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10 min	1

PCR products were purified before being used for cloning with IBI extraction kits and DNA was extracted and a gene fragment was prepared for transferring to the cloning vector.

3.2.6.2. PGEM-TEASY VECTOR

Before transferring *cry1Ia38* gene fragment to the expression vector, a T-vector as a cloning vector, pGEM-Teasy was used. For inserting a 2100 bp fragment of *cry1Ia38* gene to the cloning T-vector, poly A tail (adenine) was added to both ends of the amplified gene. For adding poly A tail, the reaction mixture was prepared as written in table 3.16 and kept at a temperature of 72 ° C for 30 minutes.

Table 3. 15. Amounts and concentrations of used materials to add the poly A tail, to the sticky end of cry1Ia38 gene.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	1	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/µl	1	0.02 U/µl
dATPs mix	10 mM	2	0.4 mM
PCR product	50 ng/µl	5	25 ng/µl
Sterile bidistilled water		1	
Total volume		10	

The ligation of PCR product with poly A tail to the pGEM-Teasy vector was performed by preparing the reaction mixture according to Table 3-17. The prepared mixture was kept at room temperature (25 ° C) for one hour.

Table 3. 16. The amounts and concentration of the materials used in the pGEM-Teasy vector ligation.

Component	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
2X ligation buffer	2X	5	1X
T4 DNA ligase	1 U/µl	1	0.1 U/µl
pGEM-Teasy vector	50 ng/µl	0.5	2.5 ng/µl
Purified PCR product with poly-A tail	50 ng/µl	2	10 ng/µl
Sterile bidistilled water	-	1.5	-
Total volume		10	

After performing the ligation, pGEM-Teasy vector containing the gene fragment was transformed into the competent cells that have the ability to replicate. Transformation was performed by thermal shock method using DH10α from *E. coli* as competent cells of. The competent cells of DH10α are used only for cloning. Vector transformation into competent cells was performed following the mentioned protocol. Two micro-tubes containing 100 µl of DH10α competent cells were taken out from -80°C freezer and 2 µl of ligation product (with insert) was added in one tube and in the other one 2 µl of ligation reaction without insert was added (as control). The cells were firstly incubated on ice for twenty minutes, then kept at 42°C for 90 seconds, and again for two minutes on ice. To each micro-tube, 800 µl of LB medium was added and kept at a temperature of 37 ° C in shaker incubator at 180 rpm for one hour. Then, 100 µl of bacterial suspension was transferred to Petri dishes containing LB medium and the antibiotic ampicillin (100 µg / ml) and X-Gal-IPTG reagent and stored at 37 ° C for one night. To investigate the transformation of recombinant colonies, from the grown white colonies, 16 bacterial

colonies were randomly selected. The selected colonies were initially sub-cultured and then used for polymerase chain reaction to confirm the ligation of DNA in pGEM-Teasy vector. In this way, 30 ml of sterile distilled water was poured into 1.5 ml micro-tubes. The selected bacterial colonies were transferred from plates to micro-tubes by an autoclaved tip. A single colony was transferred from the culture medium and added to distilled water inside the micro-tube. The micro-tubes were heated at 100 °C for 10 minutes, and then centrifuged for 1 min at 14,000 rpm. From the supernatant mixture, three microliters were removed and used in polymerase chain reaction as DNA template. The primers used in this PCR were primers for the amplification of *cryIIa38* gene, as well as the primers of vector. Thermal conditions and reaction mix were adjusted according to tables 3-18 and 3-19.

Table 3. 17. The amount and concentration of materials used for the screening of recombinant colonies by PCR.

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	10	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/µl	1	0.02 U/µl
dNTPs mix	10 mM	2	0.4 mM
Forward primer (T7 or Ia38-F)	10 µM	1	0.2 µM
Reverse primer (SP6 or Ia38-R)	10 µM	1	0.2 µM
Template DNA	-	2	-
Sterile bidistilled water		33	
Total volume		50	

Table 3. 18. PCR condition for performing the colony PCR.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	50	30 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

The product of the polymerase chain reaction was checked on 1% agarose gel electrophoresis. In case of amplification of the desired DNA fragment, the bacterial colony was cultured for one night at 37 °C at 180 rpm in four ml of the LB medium containing ampicillin antibiotic (100 µg/ml). The vector ligated with insert in the DH10α bacterial cells was extracted using the NucleoSpin Plasmid plasmid extraction kit according to the manufacturer's instructions. After determining the concentration of the extracted recombinant vectors, double digestion was performed using *Bam*HI and *Sal*I restriction enzymes for 30 minutes at 37°C (Table 3.20). To stop the digestion reaction, the mixture was kept at 65°C for 10 minutes. The products of enzymatic digestion were examined on 1% agarose gel electrophoresis. The bacterial colonies that showed two bands corresponding to the size of insert and linearized vector (indicating the presence of both the pGEM-Teasy vector and the *cryIIa38* gene insert) were detected.

Table 3. 19. The Amounts and concentration of materials used for enzymatic digestion of recombinant vector pGEM-Teasy.

Component	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
10X Fast digestion buffer	10X	10	1X
BamHI restriction enzyme	1U/µl	2	0.02 U/µl
SalI restriction enzyme	1U/µl	2	0.02 U/µl
Recombinant vector	200 ng/µl	15	30 ng/µl
Sterile bidistilled water	-	71	-
Total volume		100	

After digestion of the pGEM-Teasy vector containing *cryIIa38* gene, the bands of the gene fragments were isolated from the agarose gel and extracted using a NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit. The *cryIIa38* gene was prepared for transferring to the pET-30a expression vector (+).

3.2.6.3. THE EXPRESSION VECTOR PET-30A (+)

Prior to transferring the gene fragment to pET-30a (+), the selected expression vector was digested by *Bam*HI and *Sal*I restriction enzymes. For double digestion of pET-30a (+)vector, the reaction mixture was prepared according to Table 3-21 for 30 minutes at 37 ° C and kept at 65 °C for 10 minutes to stop the digestion.

Table 3. 20. The amounts and concentrations of materials used for double digestion of pET-30a(+) vector.

Component	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X Fast digestion buffer	10X	10	1X
<i>Bam</i> HI restriction enzyme	1U/μl	2	0.02 U/μl
<i>Sal</i> I restriction enzyme	1U/μl	2	0.02 U/μl
Recombinant vector	20 ng/μl	50	10 ng/μl
Sterile bidistilled water	-	36	-
Total volume		100	

After enzymatic digestion of pET-30a(+) vector to prevent re-circularize of the vector, dephosphorylation was performed by alkaline phosphatase enzymes. For doing this, 10 μl of a 10x dephosphorylation buffer was mixed with a unit of alkaline phosphatase enzyme (Roche, Basel, Switzerland), the desired concentration from the linear vector was added, and the final volume reached to 100 μL by adding sterile distilled water. The mixture was kept at 37 °C for four hours and later incubated at 65 °C for ten minutes to stop the reaction.

The insertion of the gene fragment extracted from the agarose gel into a linear and dephosphorylated pET-30a(+) vector was carried out by using the T4 DNA ligase enzyme (Promega Biosciences, Wisconsin, USA), according to Table 3-22. The mixture was incubated with a vector ratio of 1 to 3 for one night at 4 °C. The reaction was stopped after incubation at 65°C for 10 minutes. The transformation of the recombinant vector was carried out, as previously described for the pGEM-Teasy cloning vector. However, at this step, BL21 cells *E. coli* were used as competent cells suitable for gene expression. According to the previous section, confirmation of successful cloning was carried out through polymerase chain reaction of bacterial colonies grown on a LB medium and

digestion of the recombinant plasmid extracted from BL21 cells. The plasmid of three positive bacterial colonies were sent to StabVida Company for sequencing with three primers (forward and reversed primers of insert and forward primer of vector).

Table 3. 21. The amounts and concentration of the materials used in the pET-30a(+) vector insertion reaction.

Component	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
2X ligation buffer	2X	10	1X
T4 DNA ligase	1U/µl	1	0.1 U/µl
pET-30a(+) vector	10 ng/µl	5	2.5 ng/µl
<i>cryIIa38</i> gene	20 ng/µl	3	3 ng/µl
Sterile bidistilled water	-	1	-
Final volume		20	

The sequencing results showed that the cloned gene in nucleotide number 346 differs from the *cryIIa38* gene, so that instead of the adenine nucleotide, there is a guanine nucleotide. This difference leads to a change in one amino acid from isoleucine to valine. As a result, using a site-directed mutagenesis technique, adenine nucleotide should be replaced by guanine.

3.2.7. SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Changing the nucleotide sequence of the cloned gene was carried out using a site-directed mutagenesis based on the polymerase chain reaction. In this method, the nucleotide change is accomplished by performing a PCR using the primer where the desired mutation is entered. An important point in site-directed mutagenesis based on PCR is the proper

design of the primer. The basis of the work is that (Fig. 3.5), the plasmid is amplified by the polymerase chain reaction using the designed primers. Then, using the *DpnI* restriction enzyme under optimal conditions, native plasmids that contain the incorrect nucleotide are digested and eliminated. The *DpnI* enzyme digests DNA fragments that are not methylated and the GATC is the restriction site for this enzyme. Methylation of DNA occurs at the time of transcription in the living system (here in the used *E. coli* strain). As a result, DNA fragments amplified in the PCR are not methylated and not digested by the *DpnI* enzyme. In this way, maternal plasmids whose nucleotide sequences are misplaced or non-target are eliminated. Then, a large number of plasmid replication copies are amplified by PCR within competent cells, such as DH10 α and DH5 α (non-expressive). Transformed plasmids are extracted and sequenced. In the case of the correct mutations in the nucleotide sequence, the recombinant plasmid is transformed into the expression competent cells (BL21).

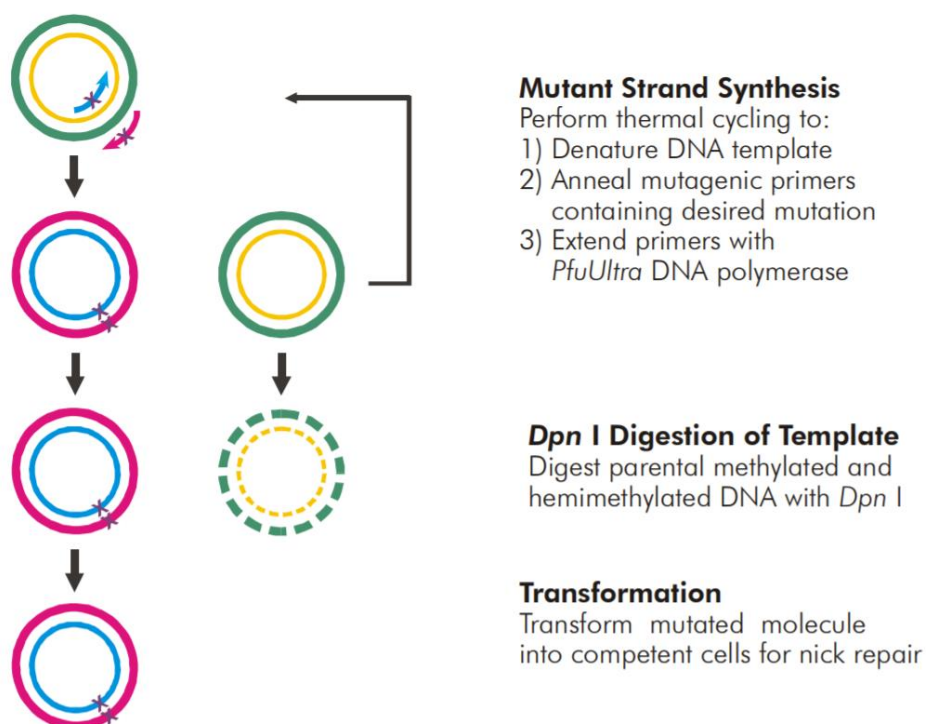


Fig. 3. 5. Different steps of site-directed mutagenesis (www.agilent.com).

3.2.7.1. PRIMER DESIGNING FOR SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

The following conditions were considered in the design of the suitable primer for site-directed mutation based on the polymerase chain reaction:

- At least eight non-overlapping nucleotides should be introduced at the 3' end of the both primers.
- The primers pairs must complement each other at 5' rather than 3' to avoid primer self-amplification and self-extension.
- The desired mutation can be placed as close as 4 bases away from the 5' terminus and at least 6-8 bases from the 3' end.
- The melting temperature of the primers was determined to be more than 75 °C.
- The length of primers was chosen between 25 and 45 pairs.
- At least one cytosine or guanine nucleotide was considered at the end of 3' and 5' ends.

Considering the above conditions, a pair of primers was designed to perform a site-directed mutagenesis based on the polymerase chain reaction (Table 3-23).

Table 3. 22. Primers used for site-directed mutagenesis based on polymerase chain reaction.

Primer length (bp)	(°C)** T _m	Primer sequence* (5'-3')	Primer
40	70.3	CAAAAA A TATCAACTTATGCAAGAAATAAAGCACTTACAG	G346A-F
44	69.3	GCATAAGTTGATA T TTTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATGTTTC	G346A-R

* The bold nucleotides in the primers indicate the point of mutation.

** The melting temperature listed in the table is calculated by the Sigma Aldrich website and varies with the usual melting temperature for primers used for the site-directed mutagenesis technique.

3.2.7.2. POLYMERASE CHAIN REACTION FOR SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

The reaction mixture and thermal conditions of polymerase chain reaction for the mutated plasmid were prepared according to Tables 3-24 and 3-25. The recombinant vector contains *cryIIa38* gene, with 7569 bp length. KAPA HiFi was used as DNA polymerase enzyme to amplify this vector. Polymerase chain reaction was carried out with a lower concentration of template and primers.

Table 3. 23. Amounts and concentrations of used reagents for site-directed mutagenesis PCR.

Components	Initial concentration	Used volume (μ l)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	5	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/ μ l	1	0.04 U/ μ l
dNTPs mix	10 mM	0.75	0.3 mM
Forward primer	10 μ M	0.75	0.3 μ M
Reverse primer	10 μ M	0.75	0.3 μ M
Template plasmid	100 ng/ μ l	0.5	50 ng/ μ l
Sterile bidistilled water	-	16.75	-
Total volume		25	

Table 3. 24. PCR condition for site-directed mutagenesis.

Cycle step	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	60	30 sec	16
Extension	72	6 min	
Final extension	72	15 min	1

3.2.7.3. REMOVAL OF MATERNAL PLASMIDS

After completing the polymerase chain reaction, the *DpnI* enzyme was added to eliminate the maternal plasmids in PCR products. Accordingly, maternal plasmids were removed and only mutated plasmids remained. An enzyme digestion mixture was prepared by adding one unit of *DpnI* enzyme at a concentration of 1 U/ μ l and 2 μ l of 10X buffer to PCR products. The prepared mixture was initially incubated for 10 minutes at 37 °C, then for five minutes at 80 °C, and finally was kept on ice for two minutes.

3.2.7.4. TRANSFORMATION OF THE RECOMBINANT VECTOR

The obtained plasmids were initially transferred into competent cells of DH10 α . Then, by performing the colony PCR with bacterial colonies, *cryIIa38* gene was amplified and sent to StabVida for the sequencing of the nucleotides. After confirming the mutation in the nucleotide, mutated recombinant plasmids were transferred to recombinant cells of BL21. The glycerol storage of 50% and 20% were prepared and BL21 cells with recombinant plasmids were stored at -20 °C and -80 °C.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

As previously mentioned, a list of candidate genes for cloning, based on the novelty of screened genes, was prepared based on LC/MS-MS and PCR results. Candidate genes included *cryIAg*, *cryIHa*, *cryIHb*, *cryIG*, *cryIAd* and *cryIIa*. The results of tracing each candidate gene are as follows.

3.3.1. *cryIAg* GENE

Based on the results of proteomics, there was a protein called Cry1Ag in the list of proteins identified in IE-1 Bt strain. Due to the lack of research on the insecticidal activity

of this protein, it was considered as an appropriate candidate for cloning. In crystalline inclusion bodies of IE-1 Bt strain, 808 peptides with the length of more than six amino acids, attributed to Cry1Ag, have been identified. From the identified peptides for this protein, 491 peptide sequences (without repetition) with a high confidence interval of 95% are related to Cry1Ag protein. Among these peptides, two peptides were found that specifically matched to Cry1Ag with a confidence level of 99%, as listed in Table 2-26. The results of tblastn and blastp indicated that the studied peptide fragments are belong to Cry1Ag protein with the accession number of Q9S515.1 access numbers and matched with *cry1Ag* gene with the accession number of AF081248.1.

Table 3. 25. Information and the sequences of the peptides attributed to Cry1Ag protein, with a confidence level of 99%.

Rank ¹	Coverage% ²	Accession number	Protein name	Contribution value ³	Sequence
126	71.6	sp Q9S515	Pesticidal crystal protein Cry1Ag	2	LSHVPMLSQAAGAVY TLR
126	71.6	sp Q9S515	Pesticidal crystal protein Cry1Ag	0.267	GWRGSHDITIQQGDDV FK

1) The rank of protein among the total proteins identified (303 proteins) in the crystals of IE-1 Bt strain.

2) The percentage of matching amino acids from identified peptides having confidence greater than 0 divided by the total number of amino acids in the sequence.

3) The contribution of this peptide, in protein score units, to the unused protein score for a protein in this group. The sum of contribution values from all black peptides in a group equals the unused protein score of the winner protein in that group.

Following the preparation of a map of the distribution of peptides attributed to Cry1Ag, a general and specific primers for amplification of whole gene was developed. The full length of *cry1Ag* gene was amplified by PCR. Based on the results, the 808 peptides related to Cry1Ag protein have covered 71.6% of the *cry1Ag* gene. These peptides were located throughout the gene using alignment tools in NCBI gene bank.

To amplify *cry1Ag* gene with 3859 bp length, four different pairs of primers were used. Two negative controls were used in this PCR: the first one did not contain template DNA and water was added instead, and the second one template DNA from HD-1 Bt strain was used, which lacked the *cry1Ag* gene. There was no positive control for this polymerase chain reaction. The presence of *cry1Ag* gene was studied in all of the seven studied Bt strains. Based on the obtained results, no fragments were amplified by the first pair of primers (Figure 3-6). Noteworthy, for the negative control of HD-1, as well as other Bt strains, using a second, third, and fourth pair of primers, the correct amplicons were amplified.

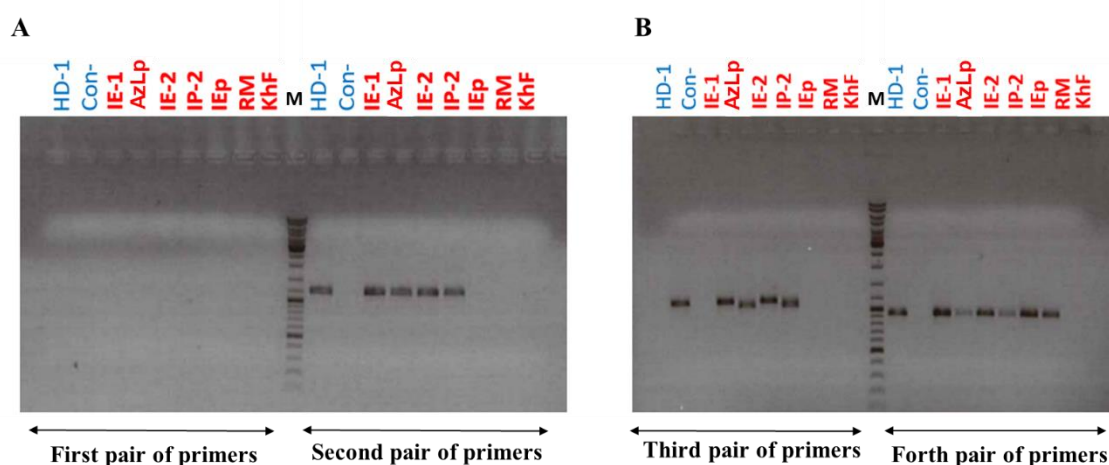


Fig. 3. 6. The results of polymerase chain reaction for *cry1Ag* gene amplification. Panel A shows the amplified parts of *cry1Ag* gene by the first and second pairs of primers, and the panel B; indicates the fragments amplified by the third and fourth pairs of primers.

Based on the nucleotide sequences of the amplified fragments in IE-1 and HD-1 Bt strains, a consensus of 2824 pp was obtained using Genious software. Blast results of these two consensus showed that part of the *cryIA* gene was amplified for the reference strain HD-1, and for the IE-1 strain, part of the *cryIA* gene. This issue had happened due to the high similarity between the two *cryIAa* and *cryIAg* genes, (97% similarity), indicate the reason for the amplification of *cryIAa* gene fragments in the HD-1 strain. Subsequently, using the genome walking technique, the nucleotide sequences of the first part of the *cryIAg* gene was not amplified by the designed primers. As explained in detail in the material and methods, in the first step, genomic DNA was prepared with high quality, purity and high concentration. Then, different amounts of DNA were prepared and each of them completely digested with different restriction enzymes that produced the sticky end, and genomic libraries were prepared. Following the preparation of the three genomic libraries, *EcoRV*, *PvuII* and *StuI*, the first polymerase chain reaction was performed. Using the first PCR product, the second polymerase chain reaction was performed to move to the upstream of the gene (Fig. 3.7).

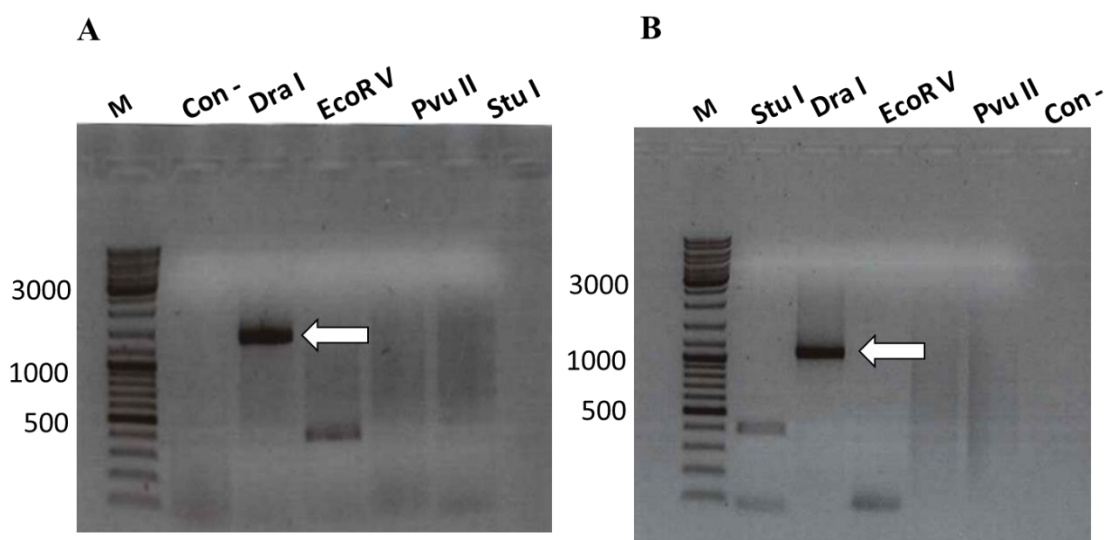


Fig. 3. 7. The first (A) and the second (B) PCR in genome walking. Letter M represents the molecular marker, Con-: negative control, and DraI, EcoRV, PvuII and StuI are the genomic libraries.

In the first PCR, fragments were amplified using the gene specific primer 1 (GSP1), in the *DraI* and *EcoRV* genomic library. Then, in the second PCR using the previous PCR products and the gene specific primer 2 (GSP2), bands were observed in the *DraI*, *EcoRV* and *StuI* libraries. It was expected that the amplified fragment in the second polymerase chain reaction would have a smaller size than the first product, since it was directed to move upstream of the gene, and the GSP2 primer to the unknown gene is closer and the primer of the GSP1 is located far away from the unknown region. According to the size of the amplified parts, in two nested PCRs, the amplified parts in the *DraI* genomic library have an appropriate proportional ratio. The amplified fragment in the first PCR of the *DraI* genomic library is about 2,000 base pairs and in the second PCR, 1,500 base pairs. The result of sequencing of the amplified fragments in both PCRs in the *DraI* genomic library indicates that the gene was fully amplified. The consensus blast results showed that the replicated gene was 100% similar with the *cryIAa* gene and 94% with the *cryIAG* gene. As a result, the *cryIAa* gene was amplified instead of the *cryIAG* gene. Based on the results of proteomics and the determination of the genetic content of the IE-1 strain, both Cry1Aa and Cry1Ag are present in this Bt strain. Consequently, it is likely that due to the high similarity of the nucleotide sequence of these two genes, the *cryIAG* gene amplifies in the IE-1 strain as well as the same *cryIAa* gene. To investigate this, specific restriction enzymes for each gene were used to cut the PCR products. As previously mentioned, selective restriction enzymes were the *SmaI* enzyme for the *cryIAa1* gene, and the *SacI* enzyme, and for the *cryIAG1* gene. After amplification of the parts of the gene where the restriction enzymes were located (Fig. 3-8, Figure A), PCR products were digested with *SmaI* and *SacI* enzymes. In this experiment, HD-1 Bt strain was also used as a control for the *cryIAa* gene. As shown in Fig. 3-8 Panel B, after digestion of the PCR products, no fragment was obtained with the specific enzyme for *cryIAG*, *SmaI*. This indicates that there is no *cryIAG* gene in PCR products and only the *cryIAa* gene has been amplified. However, the PCR amplified part was correctly cut off with the selective enzyme for *cryIAa*, *SacI*, and two pieces of 524 and 669 bp were observed in the gel. The pET30a vector was also digested by restriction enzymes showing the efficiency of the used restriction enzymes.

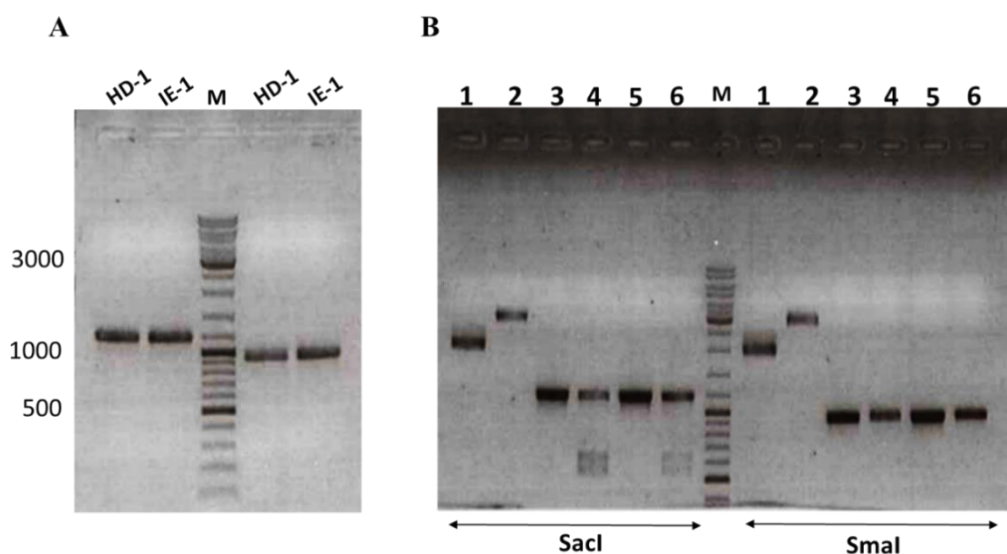


Fig. 3. 8. Digestion of PCR products of amplification of cry1Ag gene with specific restriction enzymes. Panel A; PCR products of partially amplification of cry1Ag gene, and panel B shows the digestion of PCR products using the SmaI and SacI restriction enzymes. Lane one: non-digested pET30a vector; lane two: pET30a vector digested with the restriction enzyme; lane three: PCR product, non-digested HD-1; lane four: digested PCR product of HD-1 strain; lane five: not digested PCR of product IE-1 strain, and lane six: digested PCR product of IE-1 strain.

By aligning the two *cryIAa* and *cryIAg* genes and finding variable regions in these two genes, specific primers for amplification of *cryIAg* gene was designed. Based on the results of PCR, no fragments were amplified using the specific primers of the *cryIAg* gene in the IE-1 strain. The final result is that the IE-1 Bt strain lacked *cryIAg* gene and the reason for reporting this protein in proteomics data was due to the false-positive identification of Cry1Ag protein, which is similar to other Cry proteins. The protein composition of the solubilized crystals of IE-1 Bt strain was analyzed by LC-MS/MS method two times, and each time the Cry1Ag protein was found in the list of proteins present in the crystal. It turned out, however, in the last two replicates of proteomics analysis, no specific peptide associated with the Cry1Ag protein was found.

3.3.2 *cry1Ha*, *cry1Hb*, *cry1G* AND *cry1Ad* GENES

Considering the difficulties in finding *cry1Ag* gene, *cry1Ha*, *cry1Hb*, *cry1G* and *cry1Ad* candidate genes, the list of specific peptides for each protein has been prepared (Table 3.27).

Table 3. 26. Information on candidate proteins for cloning.

Bt strain	Peptide (95%)	Specific peptide ¹	Accession number	Protein name	Contribution value	Coverage%
IP-2	256	20	sp Q45748	Pesticidal crystal protein Cry1Ha	18.79	32.51
IE-1	102	12	sp Q45718	Pesticidal crystal protein Cry1Hb	11.56	21.99
IE-1	272	29	sp Q03744	Pesticidal crystal protein Cry1Ad	28.08	60.22
IEp	281	3	sp Q9ZAZ6	Pesticidal crystal protein Cry1Gb	6	33.19

1) The number of peptides that are specifically assigned to only one protein.

Then, according to the location of the detected peptides, the sequences of amino acids were returned to the nucleotide sequence on the desired gene and degenerative primers were designed.

As a result, polymerase chain reactions did not amplify any parts of the desired genes. Because, the same mistake as the Cry1Ag protein, occurred in the *cryIHa*, *cryIHb*, *cryIG* and *cryIAd* genes. Finally, it was decided to analyze the proteomics data based on new criteria. The criteria are as follows:

1- Unused value: A measure of the protein confidence for a detected protein, calculated from the peptide confidence for peptides from spectra that are not already completely “used” by higher scoring winning proteins.

2- Contribution value: The value of contribution for each peptide with a length of more than six amino acids, between zero and two. If the peptide has a contribution value of two, it means that it has a protein with a high confidence level of 99%. The total value of the specific peptides involved for each protein is defined and reported as unused value.

3- Rank: The rank of the protein group for which this protein is the winner. The more peptides detected for a specific protein, the higher the rank (the first, the highest rank) will be assigned to that protein.

4. NCBI: The location of the peptides associated with each protein should be investigated in the NCBI gene bank. If the identified peptides are located in the conserved part of the *cry* genes, the result is not reliable.

3.3.3. *cryIIa* GENE

Based on the results obtained from the determination of the gene content of Bt strains, the only remaining candidate gene for cloning was the *cryII* gene. The *cryII* gene was expressed in five strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp Bt. The complete sequence of *cryII* gene, determination, and gene were fully identified. The results of the *cryII* gene amplification are described using three pairs of primers in Fig. 3-9.

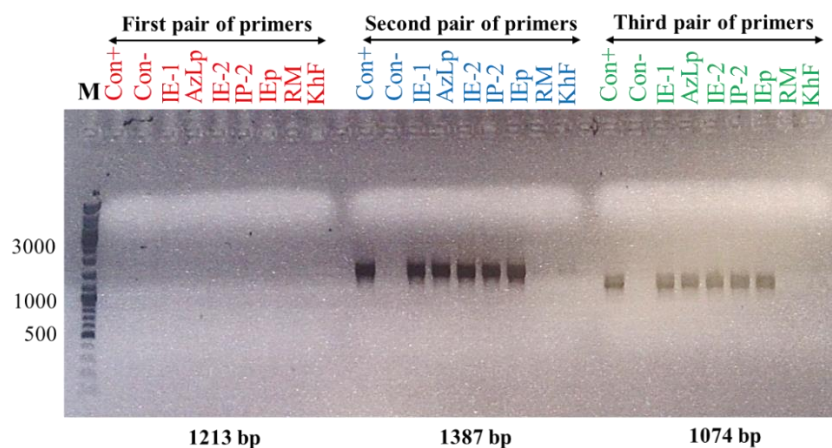


Fig. 3. 9. The amplification of the *cryII* gene with three pairs of primer.

As shown in the figure above, the 5' part of the gene has not been amplified. As a result, similar to the *cryIAg* gene, using the genome walking technique, the whole gene was also amplified (Fig. 3.10).

The fragments amplified by the first and the second PCRs in genome walking in the *DraI* and *PvuII* genomic libraries were sequenced. The obtained consensus is 3162 bp in length. The full length gene was deposited at the NCBI gene bank, with accession number of MG584186. Consequently, Bt δ -endotoxin nomenclature committee, named our novel gene, *cryIIa38*.

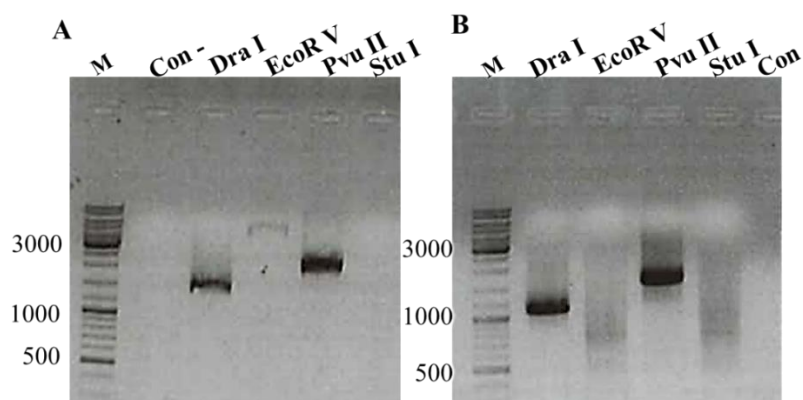


Fig. 3. 10. The results of the first (A) and the second (B) polymerase chain reactions for the *cryII* gene amplification in the genome walking technique. The letter M; represents the marker, con-: a negative control; *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* and *StuI*; genomic libraries provided.

3.3.4. CLONING OF *cryIIa38* GENE

The fragment of 2112 bp length was amplified by the specific primers to clone *cryIIa38* gene. Before performing the ligation in the *cryIIa38* gene cloning, all the steps and the used components were examined on a 1% agarose gel. Then, the ligation step was performed and the recombinant vector was transformed into the BL21 competent cells from *E. coli*. The correct recombinant vectors were detected through colony PCR (Fig. 3.11) and double digestion of the recombinant plasmid extracted from BL21 (Figure 3.12). For this purpose, 22 bacterial colonies were selected randomly, and in 14 colonies, the presence of the target gene in the recombinant vector was tested by polymerase chain reaction using cloning primers. The results showed that out of 14 tested colonies, 12 of them were positive and the gene was successfully cloned.

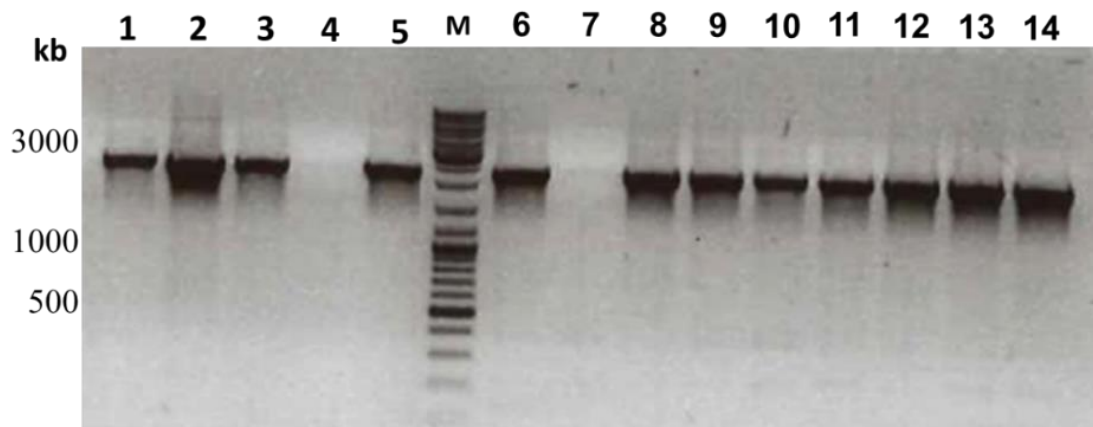


Fig. 3. 11. The result of the colony PCR in the recombinant *pET30a-cryIIa38* vector. The letter *M*; represents the molecular marker and the specified numbers shows the examined *E. coli* colonies.

In eight other bacterial colonies, the presence of the insert was studied based on the double digestion method (Fig. 3.12). Based on the results of double digestion of recombinant vectors, cloning in four *E. coli* colonies was correctly performed, in which two bands were detected corresponding to the size of linear vector and the insert (*cryIIa38* gene).

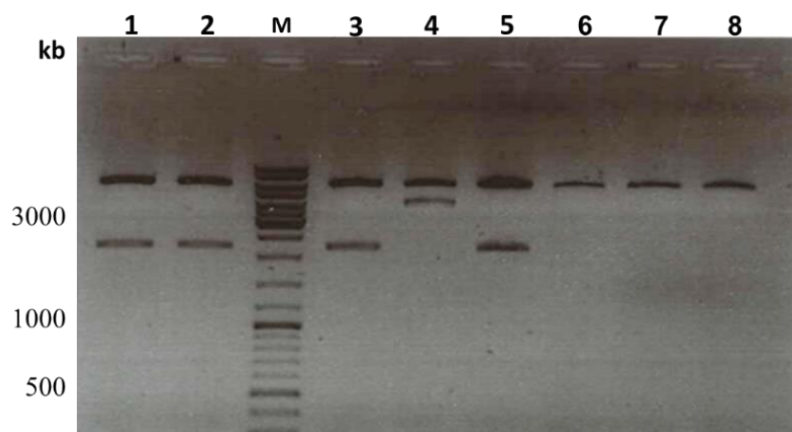


Fig. 3. 12. *The result of double digestion of recombinant pET30a-CryIIa38 vector. The letter M; represents the molecular marker and the specified numbers shows the examined E. coli colonies.*

The extracted plasmid of three positive bacterial colonies were sent to StabVida Company for sequencing with three primers (forward and reverse primers of insert and forward primer of vector). The sequencing results showed that the cloned gene in nucleotide number 346 located in domain I differs from the *cryIIa38* gene. In this position adenine was replaced wrongly by guanine. This difference leads to a change in one amino acid, instead of isoleucine, valine has been found. Consequently, this substitution was performed by using site-directed mutagenesis technique.

3.3.5. Site-directed mutagenesis

The substitution of the nucleotide in the gene sequence of the cloned gene was carried out using site-directed mutagenesis based on the polymerase chain reaction. In this method, the nucleotide change was accomplished by performing a PCR using the primer where the desired mutation was introduced. The result of the PCR assay is shown in Fig. 3.13, which has been amplified in six different annealing temperatures, and the recombinant vector has been fully amplified.

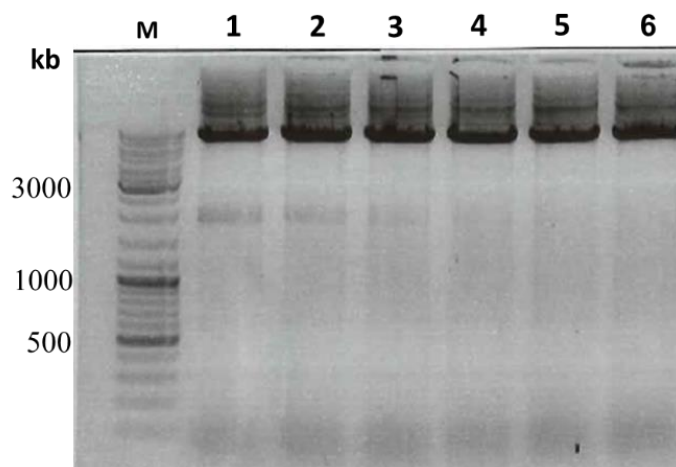


Fig. 3. 13. The recombinant pET30a-cryIIa38 vector amplification for changing one nucleotide in cryIIa38 gene. The letter M indicates the molecular marker and the specified numbers shows the different annealing temperatures, which are 45.4, 48, 50.7, 53.5, 56, 58.1, and 59.8 °C, respectively.

After transformation recombinant vector into the competent cells, cloning has been confirmed by performing double digestion method.

Six recombinant vector extracted from competent cells were sent to StabVida Company for sequencing. The sequence of the cloned gene was determined using three primers: forward, reverse, and intermediate. The results indicated that nucleotide replacement was performed correctly in each of the six recombinant vectors, and the adenine nucleotide was replaced by guanine.

Based on the results obtained in the third chapter of this dissertation, a new gene was found in the IE-1 Bt strain. The novel gene and was named *cryIIa38* according to the Bt δ -endotoxin nomenclature committee. The *cryIIa38* gene was successfully cloned. Similarly, the mutant of this gene was obtained with a nucleotide difference at position 348 located in the second amplification, called *cryIIa38-I116V*.

Considering the unique features of CryII protein family, including dual activity against lepidopteran and coleopteran insect pests, the question was raised that whether the new CryIIa38 toxin has an insecticidal and cytotoxic activity on the Lepidopteran pests. Also, in the case of the CryIIa38-I116V, the question came whether the change in one amino

acid affects the toxicity of Cry1Ia38 wild-type. In other words, due to the difference in only one amino acid in the Cry1Ia38 protein and the Cry1Ia38-I116V mutant, are the structural characterization and insecticidal activities of these two toxins differ? And finally, is there a similarity between the structure and activity of the two toxins Cry1Ia38 and Cry1Ia38-I116V, with another Cry1Ia toxin, called Cry1Ia7? To find the answer to the above questions, the experiments of the next chapter were designed and implemented.

CHAPTER FOUR
ASSESSMENT OF INSECTICIDAL AND CYTOCIDAL
ACTIVITY OF Cry1Ia TOXINS

4.1. INTRODUCTION

After the cloning of the *cryIIa38* gene, the desired protein was expressed, extracted and purified. Also, the *cryIIa7* gene present in a Spanish Bt strain, HU4-2, previously cloned by Ruiz de Escudero et al. (2006), expressed and purified. There is a homology of the 96% in sequence of amino acids in the two CryIIa38 and CryIIa7 proteins. Therefore, CryIIa7 toxin was also used in this study to examine if a small difference in the sequence of amino acids leads to a change in the insecticidal activity of Bt toxin. In addition, the mutant protein derived from *cryIIa38* gene, *cryIIa38 -I116V* gene, which differs in only one amino acid comparing to the wild-type gene, was also expressed, extracted and purified. As a result, the three proteins CryIIa38, CryIIa38-I116V and CryIIa7 were studied and compared in terms of the molecular characterization, insecticidal and cytotoxic activities.

To better understand the mode of action of Bt toxins, complementary information will be obtained based on different steps in toxicity of Bt toxins including; receptor binding, oligomer formation, pore formation and the role of each the Bt proteins receptors. This complementary information will be obtained base on single point mutation to check which amino acid is responsible for the different steps mentioned above. Therefore, different point mutations are done to remove, add, or replace an amino acid in order to modify the structure of the toxin. Moreover, sometimes a part of Bt toxin structure is eliminated (Ocelotl et al., 2015) to determine the effect of modified toxin and the role of the deleted portion. In Figure 1.4, a summary of the examined mutations, the importance and role of each mutation in CryIAa toxin function and its insecticidal activity is presented.

Based on the results of the previous studies, the change or changes (mutations) that have been occurred in domain II, influenced the specificity of Bt Cry toxins (maybe modification or improvement). Also, point mutations occurring in loop sequences of domain II, in many cases led to the introduction of mutants with increased insecticidal activity. The point mutation of N372A in the second loop of CryIAb toxins, and the triple mutations of N372A, A282G and L283S in the same loop, increased the toxicity of this

toxin by 8 and 36 times, respectively, compared to wild-type against *L. dispar* larvae. Interestingly, increased insecticidal activity has a direct and positive correlation with increased affinity of toxin binding to the receptors on epithelial cells of *L. dispar* larvae midgut (Rajamohan et al., 1996).

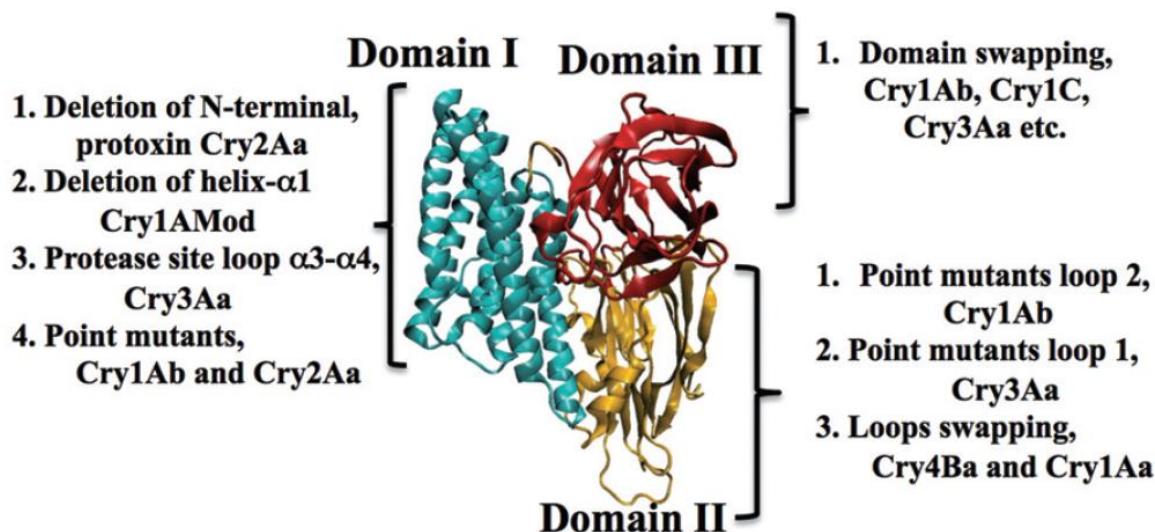


Fig. 4. 1. The three-dimensional structure of Cry1Aa toxin, focusing on the points where the changes or mutations, increase the insecticidal activity in various Cry toxins (Bravo et al., 2013).

These results suggest that domain II loop swapping could provide a strategy for improving or changing the specificity of Cry toxins. Site-directed mutagenesis of domain II loop sequences has in some cases resulted in mutant toxins with increased insecticidal activity. The first example of domain II loop mutants with increased insecticidal activity was Cry1Ab toxin where mutations in loop 2 resulted in higher insecticidal activity against Gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Rajamohan et al., 1996). A single Cry1Ab mutation in loop 2, N372A, or a triple loop 2 mutant in residues N372A, A282G and L283S showed 8- and 36-fold higher toxicity to Gypsy moth larvae respectively. Interestingly, the increased insecticidal activity correlated with increased binding affinities to BBMV isolated from Gypsy moth (Rajamohan et al., 1996). Similarly, it was shown that mutations of domain II loop regions in the coleopteran Cry3Aa resulted in enhanced

toxicity to yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) (Wu et al., 2000). A triple domain II loop 1 mutant R345, Y350F, Y351F showed tenfold higher toxicity to yellow mealworm than Cry3Aa and twofold higher toxicity against Colorado potato beetle that correlated with twofold higher binding affinity to Colorado potato beetle BBMV (Wu et al., 2000). These results show that domain II loop regions are key binding regions of Cry toxins that are suitable targets for mutagenesis and selection of Cry toxins with improved insecticidal properties. In the case of domain III, there are just few examples of mutations in two different exposed loop regions with some mutants showing a moderate non-significant increase in toxicity against different insect species (Xiang et al., 2009; Lu et al., 2011; Shan et al., 2011). Nevertheless, there are few studies that have mapped the domain III binding epitopes with ALP or APN receptors (Atsumi et al., 2005; Gómez et al., 2006; Arenas et al., 2010). Mutagenesis of these domain III binding regions is likely to provide means for increasing Cry toxins insecticidal activity such as domain III swapping that has been shown to create novel toxins with improved toxicities (de Maagd et al., 2000).

Besides the domain I mutations introducing protease cleavage sites described above, two other modifications in domain I of Cry1Ab or Cry2Aa have shown to increase insecticidal activity. Cry1Ac helix α 5 mutant V171C was shown to have 25-fold higher insecticidal activity against Gypsy moth without affecting its toxicity to the tobacco hornworm (Alzate et al., 2010). The increased toxicity of Cry1Ac V171C was proposed to be due to a higher unfolding rate allowing the more rapidly partitioning of the toxin into the membrane (Alzate et al., 2010). In the case of Cry2Aa, two modifications in domain I resulted in a Cry2Aa mutant with four- to six-fold higher toxicity against cotton leaf worm (*S. litura*), cotton bollworm (*H. armigera*) and black cutworm (*Agrotis ipsilon*) (Mandal et al., 2007). The first modification that enhanced threefold the toxicity of Cry2Aa, consisted in the deletion of the first 42 amino acid residues at the N-terminal end. Cry2Ab three-dimensional structure revealed the first 49 amino acids precedes domain I helix α 1 and these residues are normally cleaved out during protease activation of Cry2Ab protoxin. This N-terminal fragment was shown to occlude a domain II hydrophobic patch proposed to be involved in receptor interaction (Morse et al., 2001). Thus, the proteolytic cleavage of the N-terminal protoxin fragment could be a rate-limiting step that is avoided with the 42 amino acid deletion (Mandal et al., 2007). Two additional point mutations in

Cry2Aa helix α 1 residues K63F and K64P were introduced based on enhancing the hydrophobic nature of a putative transmembrane region identified in silico (Mandal et al., 2007). Finally, a threefold increase in the insecticidal activity of Cry3Aa against Asian longhorn beetle (*Anoplophora glabripennis*) was achieved by fusion of an eight amino acid residue peptide (Guo et al., 2012).

It has been shown that areas of the exposed loops in domain II play a determining role in the specificity of Cry toxins (Bravo et al., 2005). Cry4Ba toxin has a toxic effect on *Culex spp.* mosquitoes. While Cry4Aa toxin is toxic for all mosquitoes (Abdullah et al., 2003). The sequences of the amino acids of the third loop in domain II of Cry4Aa was fused to regions of second loop of domain III of Cry4Ba. Based on the results the new mutant (4BL3GAV) retains its insecticidal activity against *A. aegypti*, and also showed toxicity towards *Culex spp.* mosquitoes (Abdullah et al., 2003). The same has been done for Cry1Aa, the loop regions of the domain II of Cry1Aa toxin were engineered to imitate the 4BLGAV mutant of Cry4Ba toxin. The results indicate that modified and engineered Cry1Aa toxin is toxic for, *C. pipiens* larvae, although its activity is three times less than the 4BLGAV mutant (Liu and Dean, 2006).

In the case of Cry2Aa toxin, two changes in the domain I produced a mutant that is four to six times more toxic than the wild-type for *S. litura*, *H. armigera* and *Agrotis ipsilon* (Mandal et al., 2007). The first change that increased the toxicity of Cry2Aa three folds, included the removal of 42 amino acids from the N-terminal end of this toxin. The three-dimensional structure of the Cry2Aa toxin showed that these 49 amino acids form α -1 helix, which is usually removed during the activation of the Cry2Ab protoxins by proteases. Two other point mutations in the α -1 helix, K63F, and K64P have been introduced into the Cry2Aa toxin, which increases the hydrophobicity of the membrane portion of this toxin (Mandal et al., 2007).

With the assumption that insecticidal activity of Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7 toxins are different, the experiments of this chapter were designed and performed.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. THE EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF THE CRY1IA38 PROTEIN

The expression of Cry1Ia38 in recombinant *E. coli* BL21 cells was carried out as reported by Ruiz de Escudero et al. (2006), with slight modifications. Briefly, the expression of Cry1Ia38 in 750 ml of tryptone-yeast extract (2×TY) culture medium with kanamycin (50 µg/ml), was induced with 1 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 25°C for 2 hours. Then, cells were recovered by centrifugation at 16,000 ×g for 15 min. Each gram of cell pellet was resuspended in 10 ml of binding buffer (40 mM imidazole, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, pH 7.9). Enzymatic cell lysis was performed after 30 min incubation at room temperature with 0.2 mg/ml of lysozyme, 20 µg/ml of DNase and 1 mM of PMSF. Cells were then lysed mechanically with 10 cycles of sonication (60 seconds pulse on, 60 seconds pulse off). Protein purification was performed by affinity purification using a HisTrap™ FF crude column (GE Healthcare Bio-Sciences, Upsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Eventually, protein dialysis was done with SnakeSkin™ Dialysis Tubing (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) to exchange the elution buffer with carbonate buffer (50 mM Na₂CO₃, 100 mM NaCl, pH 11.3). Cry1Ia38 protoxin quantification was determined by Bradford assay (1976).

Cry1Ia38 protoxin was trypsin-activated for insect bioassays and cell viability assays. The activation was carried out with 10% trypsin (w/w) for two hours at 37°C. Cry1Ia38 protoxin and trypsin-activated were analyzed by sodium dodecyl sulfate 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as described by Laemmli (1970). After separation of trypsinized protein with SDS-PAGE, the concentration of Cry1Ia38 active toxin was estimated by densitometry using TotalLab Quant software (version 12.3), using bovine serum albumin, as a standard protein.

4.2.2. ASSESSMENT OF THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF CRY1IA38 PROTEIN

The insecticidal and cytotoxic activities of Cry1Ia38 were evaluated on *O. nubilalis*, *G. molesta*, *S. exigua*, *S. littoralis* and *H. armigera* larvae and Sf21 cells.

4.2.2.1 BIOASSAYS

A single concentration of 1000 ng/cm² of protoxin and activated toxin Cry1Ia38 was used for bioassays based on surface contamination method. Insecticidal activity and growth inhibitory effect of Cry1Ia38 protein on first instar larvae of *O. nubilalis*, *G. molesta*, *S. exigua*, *S. littoralis* and *H. armigera* were investigated. Bioassay experiments were repeated three times and in each replicate, 48 first instar larvae were used. The larvae in the control were treated with 50 mM carbonate buffer with pH 10.5. Bioassay trays were kept at 25 ± 1°C, relative humidity 60 ± 5% and 16 hours light / eight hours darkness. The number of dead larvae and larvae remaining at the first instar were recorded after seven and ten days.

4.2.3. CELL VIABILITY ASSAY

The cytotoxic activity of Cry1Ia38 protoxin and activated toxin were performed based on cell viability, as described previously in 2.2.16.2 section, on Sf21 cells. Ten microliters of different concentrations of protoxin and trypsin activated protein Cry1Ia38 (20, 4, 0.8 and 0.16 µg / ml) were seeded into each well of a 96-well plate containing 2 × 10⁶ cells / ml. After 24 hours of treatment the number of viable Sf21 cells was measured by adding 20 µl of the CellTiter 96® Aqueous One Solution to each well and measuring the absorbance at 490 nm wavelength in a spectrophotometer. The morphological changes of Sf21 cells were recorded after 24 hour exposure to protoxins and activated toxin of Cry1Ia38 protein.

4.2.4. EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF THE CRY1IA38-I116V MUTANT

Expression, extraction, purification and activation of the Cry1Ia38 mutant were performed as previously described for the Cry1Ia38 protein.

4.2.5. ASSESSMENT OF THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF CRY1IA38-I116V

The insecticidal and cytotoxic activities of the Cry1Ia38 mutant (Cry1Ia38-I116V) were studied on first instar larvae of *O. nubilalis*, *G. molesta*, *S. exigua* and *S. littoralis* and on Sf21 cells.

4.2.5.1. BIOASSAY

Toxicity and growth inhibitory activity of two concentrations of 100 and 1000 ng/cm² of protoxin and activated toxin of Cry1Ia38 mutant was studied against *O. nubilalis*, *G. molesta*, *S. exigua* and *S. littoralis* larvae based on surface contamination method. Bioassay experiments were performed in three replicates and 48 first instar larvae were used in each replicate.

4.2.5.2. CELL VIABILITY ASSAY

Cell viability was assayed using CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent based on tetrazolium salt (MTT- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction method. The cytotoxic activity of protoxins and trypsinized toxin of Cry1Ia38-I116V protein was determined against Sf21 cells. The concentration of cells was measured with a Countess Automated Cell counter (Invitrogen). Then, 100 µl of cell suspension (in Grace's medium without FBS) at a concentration of 2×10^6 cells/ml, was seeded into 96-well plates and incubated at 25°C at least for two hours. Subsequently, 10

µl of trypsin activated Cry1Ia38-II16V at several concentrations (0.16, 0.8, 4 and 20 µg/ml) was added into each well. Cell viability was measured at different times (16, 24 and 48 hours) after exposure to Cry1Ia38-II16V, by adding 20 µl of CellTiter 96® AQueous One Solution reagent. After two hours of incubation, the amount of formazan produced (proportional to the number of living cells) was measured by absorbance at 490 nm with a spectrophotometry plate reader (Tecan Infinite Pro200). Negative and positive control wells received 10 µl of either protein buffer (50 mM Na₂CO₃ buffer, 100 mM NaCl, pH 10.5) or 0.2% Triton X-100, respectively. The percentage of viability was calculated as: [(Absorbance sample - Absorbance positive control) / (Absorbance negative control - Absorbance positive control)] x 100. The viability assays were carried out in duplicate and repeated three times. Analyses were conducted with GraphPad Prism software.

4.2.6. EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF CRY1IA7 PROTEIN

The Cry1Ia7 protein is derived from a Spanish Bt strain, called HU4-2 (Martínez et al. 2004) The amino acid sequences of two proteins Cry1Ia7 and Cry1Ia38 are 96% similar. These two proteins differ in 27 amino acids out of 719 total amino acids in their protein sequences. The insecticidal activity of these two proteins, derived from different Iranian and Spanish strains of Bt, was compared. Cry1Ia7 protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) recombinant cells. The expression, extraction and purification of Cry1Ia7 protein was carried out according to the method described for Cry1Ia38 protein. The small amino acid difference seems to be effective in stability of protein in the buffer. The suitable buffer for Cry1Ia7 protein is 50 mM carbonate buffer, 100 mM sodium chloride at pH 11.

4.2.7. ASSESSMENT OF THE INSECTICIDAL AND CYTOCIDAL ACTIVITY OF CRY1IA7 PROTEIN

The insecticidal activity of Cry1Ia7 protein was investigated against first instar larvae of *O. nubilalis*, *G. molesta*, *S. exigua* and *S. littoralis*. The cytotoxic activity of trypsin activated Cry1Ia7 was assessed against Sf21 and Hi5 cells. Bioassays of the Cry1Ia7 protoxin at a concentration of 1000 ng/cm² on first instar larvae of *G. molesta* and *S.*

littoralis based on the surface contamination method were performed. The activated toxin activity of Cry1Ia7 protein was tested in the same way. Bioassay experiments were performed in three replications and 48 first instar larvae were used in each replicate. The procedure for conducting bioassay experiments was carried out in accordance with the previous section. The cell viability assay with Cry1Ia7 activated toxin was carried out base on tetrazolium salt reduction method as described in the previous section. For this assay, 100 µl of Sf21 and Hi5 cells with a concentration of 2×10^6 cells / ml were treated with 10 µl of Cry1Ia7 toxin with four diferent concentrations of 20, 4, 0.8 and 0.16 µg/ml. The percentage of viable cells was recorded 16, 24 and 48 hours after exposing to the toxin.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1. EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF CRY1IA38 PROTEIN

Cry1Ia38 protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells and a protein with a molecular weight of 80 kDa was obtained as a protoxin. After activating 80 kDa protein with the trypsin enzyme, the activated form of Cry1Ia38 toxin, with a molecular weight of 50 kDa, was obtained (Fig. 4.2). The concentration of Cry1Ia38 protoxin and activated toxin was estimated by densitometry using TotalLab Quant software (version 12.3), using bovine serum albumin, as a standard protein.

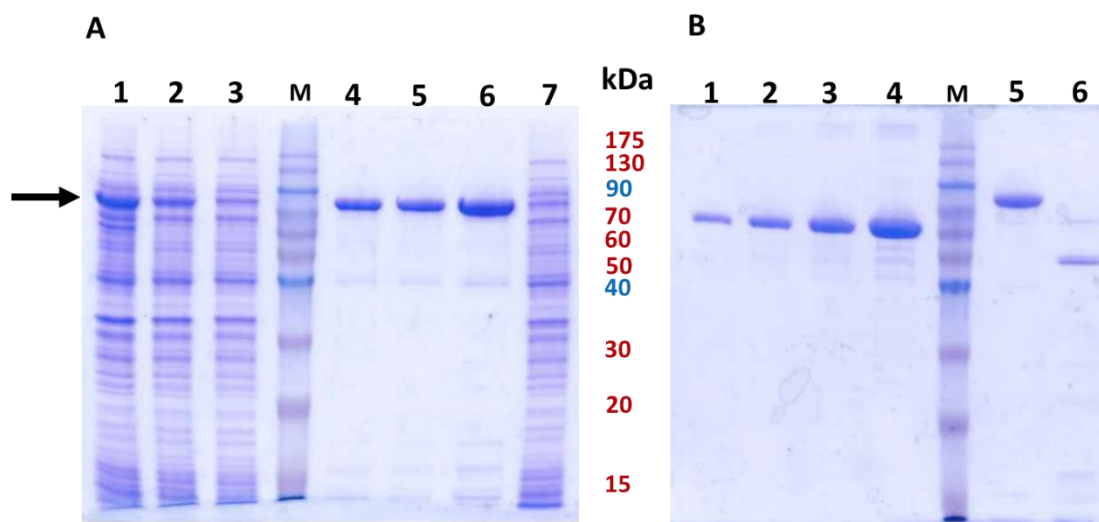


Fig. 4. 2. Expression, purification and activation of CryIIa38 protein. Panel A; lanes 1 to 3: Protein expression in *E. coli* cells, M: Pink pre-stained protein ladder, Nippon genetics, lane 4: CryIIa38 protein after purification, lanes 5 and 6: CryIIa38 protein after dialysis, lane 7: flow thorough. Panel B; lanes 1 to 4: Four different concentrations of BSA as standard protein 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml, M: Protein Marker, Lane 5: CryIIa38 purified and dialyzed protoxin and lane 6: CryIIa38 activated toxin. The arrow indicates CryIIa38 protoxin.

4.3.2. THE INSECTICIDAL ACTIVITY CRY1IA38 TOXIN

The insecticidal activity of Cry1Ia38 protoxin and trypsin activated toxin was investigated at a single concentration of 1000 ng/cm² against first instar larvae of *O. nubilalis*, *S. exigua*, *G. molesta*, *S. littoralis* and *H. armigera*. The results of bioassays performed with the Cry1Ia38 protein are presented in Table 4.1. Based on the results, Cry1Ia38 protoxin and activated toxin had the highest level of toxicity on *G. molesta* larvae. Also, Cry1Ia38 protoxin caused 100% mortality on *O. nubilalis* larvae, while Cry1Ia38 activated toxin causes 45% mortality on the first instar larvae of *O. nubilalis*. In other words, there is a significant difference (p-value = 0.0003) between the susceptibility of first instar larvae of *O. nubilalis* to protoxin and activated toxin of Cry1Ia38. However, there was no

significant difference between the susceptibility of the larvae of other tested lepidopteran pests to Cry1Ia38 protoxin and activated toxin. As shown in the table, *S. exigua*, *S. littoralis* and *H. armigera* larvae showed lower susceptibility to Cry1Ia38 protein. As a result, *G. molesta* and *O. nublalis* were recognized as the most susceptible hosts for Cry1Ia38 protein.

Table 4. 1. Toxicity of protoxin and trypsin activated Cry1Ia38 against lepidopteran first instar larvae (Mortality \pm standard error).

Cry1Ia38 protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm²)	Activated toxin (1000 ng/cm²)
<i>O. nubilalis</i>	100 \pm 0 ^{a*}	45 \pm 9 ^b
<i>S. exigua</i>	20 \pm 10 ^b	17 \pm 10 ^c
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a
<i>S. littoralis</i>	15 \pm 2 ^b	13 \pm 4 ^c
<i>H. armigera</i>	0 \pm 0 ^c	0 \pm 0 ^c

* Statistics of one-way ANOVA analysis for each column data are included, and the analyses which rendered P values lower than 0.05 were followed by Tukey test. Different letters within each column represent statistical significant differences (Tukey test P-value\0.05) among different insect species used.

4.3.3. THE CYTOCIDAL ACTIVITY OF CRY1IA38 PROTEIN AGAINST SF21 CELLS

The cytotoxic Activity of the Cry1Ia38 protein was investigated against Sf21 cell line. The percentage of viable Sf21 cells was determined according to the percentage of live cells in the negative and positive controls, which received 50 mM carbonate buffer (pH 10.5) and Triton X-100 0.2%, respectively. The results showed that Cry1Ia38 protoxin

and activated toxin had no toxicity for Sf21 cells. Also, there was a statistically significant difference between the percentage of live viable cells after exposure to different concentrations (p-value = 0.8745) of protoxin and active toxin (p-value = 0.5106). (Figure 4.3). Most of the Sf21 cells (90%) were alive and metabolically active after exposing to the highest concentration (20 µg/ml) of Cry1Ia38 protoxin and activated toxin for 24 hours. No morphological changes were observed in Sf21 cells after being incubated with the Cry1Ia38 protein for 24 hours (Fig. 4.4).

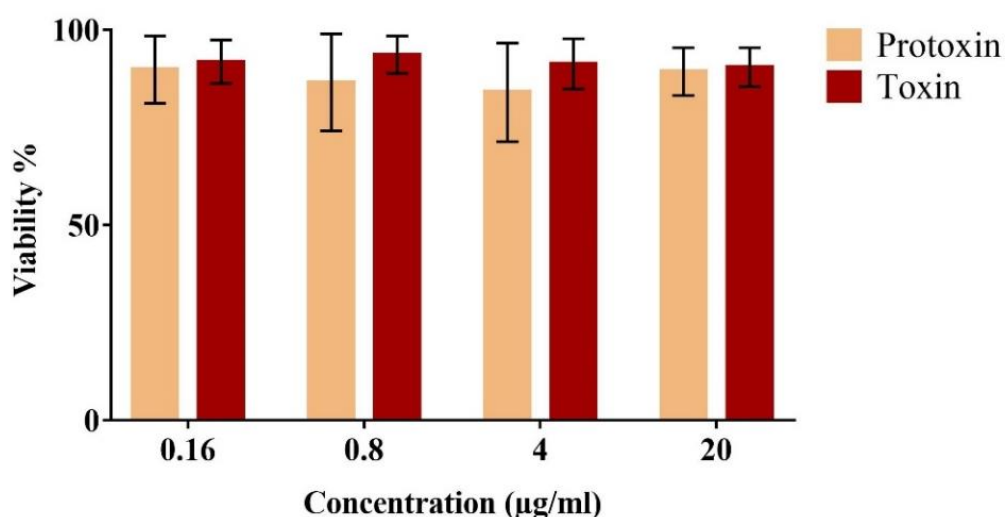


Fig. 4. 3. Susceptibility of Sf21 cells to protoxins and trypsin activated Cry1Ia38 protein. Bars represent percentages of viability after 24 h of exposure to different concentration of Cry1Ia38 protein. SE of the results from three different experiments were represented in each bar.

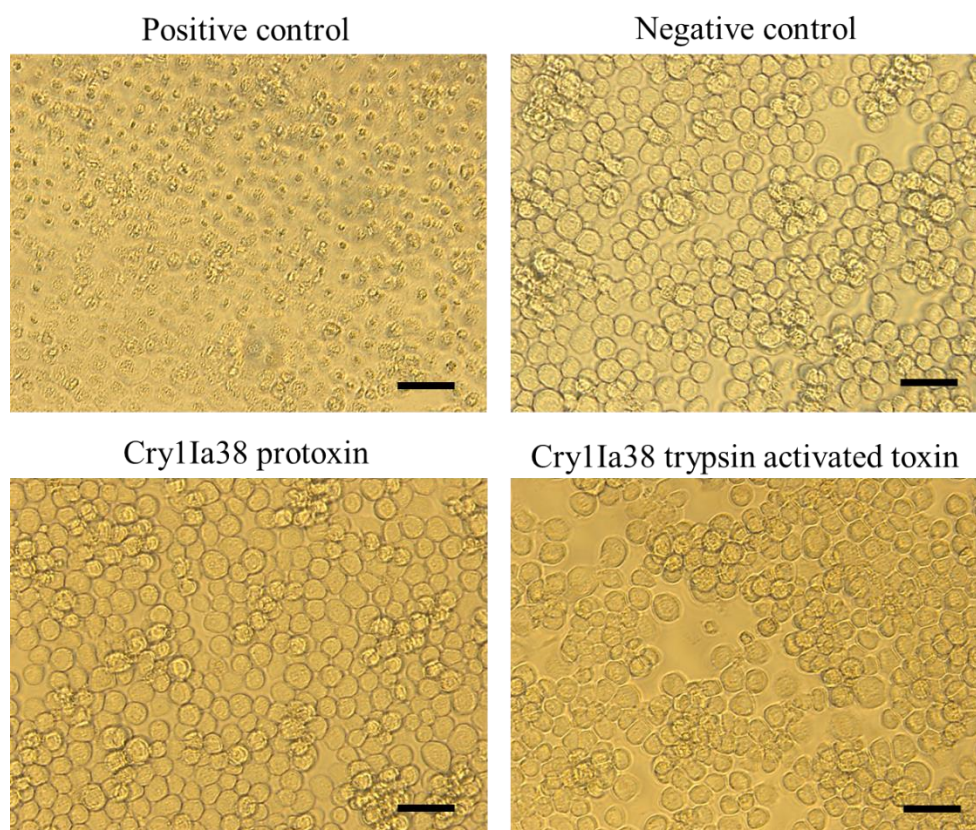


Fig. 4. 4. *Sf21* cells after treatment with Cry1Ia38 protoxin and activated toxins. Morphological changes recorded after 24 h of exposure to different concentrations of protein. Bars in the figure represent 50 μ m.

4.3.4. EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF THE CRY1IA38-I116V PROTEIN

Cry1Ia38-I116V protein was also expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. As a result, a protein with a molecular weight of 80 kDa was purified from the cells of *E. coli* as a protoxin. Cry1Ia38-I116V protoxin with a molecular weight of 80 kDa was activated with a 1:10 weight/weight ratio of trypsin and resulted in an active form of Cry1Ia38 -I116V toxin, with a molecular weight of 50 kDa (Fig. 4.5). The concentration of protoxin and activated toxin of Cry1Ia38-I116V was determined using four different concentrations of BSA, by densitometry using a Total-Lab software.

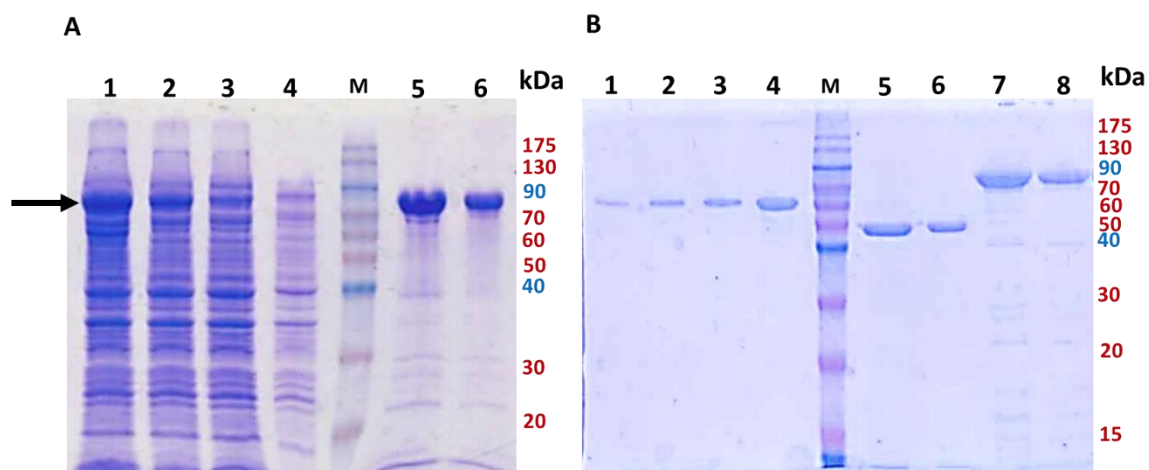


Fig. 4. 5. Expression, purification and activation of the CryIIa38-I116V protein. Panel A: Lanes 1 to 3: Protein expression in *E. coli* cells Lane 4: Flow thorough , M: Protein markers, Lanes 5-6: Protein CryIIa38-I116V After purification and dialysis, and panel B, lanes 1 to 4: four concentrations of BSA standard protein 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml, M: Protein Marker, lanes 5 and 6: activated, purified, and dialyzed CryIIa38-I116V toxin, and lanes 6 and 7: purrified and dialyzed protoxin CryIIa38-I116V. The arrow in Figure refers to the protoxin CryIIa38-I116V.

4.3.5. THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF CRYIIA38-I116V TOXIN

The insecticidal activity of protoxin and activated toxin of CryIa38-I116V at single concentration of 1000 ng /cm² was assessed against first instar larvae of *O. nubilalis*, *S. exigua*, *G. molesta* and *S. littoralis*. Bioassay results indicated that activated toxin of CryIIa38-I116V did not have insecticidal activity on the studied insects. While the protoxin of mutant was highly toxic for *G. molesta* and *O. nubilalis*, causing 100 and 95% mortality on treated larvae. There is no significant difference between the susceptibility of *O. nubilalis* and *G. molesta* to activated toxin of CryIIa38-I116V.

Table 4. 2. Toxicity of protoxin and trypsin activated Cry1Ia38-I116V against lepidopteran first instar larvae (Mortality \pm standard error).

Cry1Ia38 -I116V protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm²)	Activated toxin (1000 ng/cm²)
<i>O. nubilalis</i>	95 \pm 2 ^{a*}	11 \pm 5
<i>S. exigua</i>	12 \pm 3 ^b	0 \pm 0
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	4 \pm 2
<i>S. littoralis</i>	4 \pm 2 ^b	4 \pm 2

* Statistics of one-way ANOVA analysis for each column data are included, and the analyses which rendered P values lower than 0.05 were followed by Tukey test. Different letters within each column represent statistical significant differences (Tukey test P-value\0.05) among different insect species used.

4.3.6. THE CYTOCIDAL ACTIVITY OF CRY1IA38-I116V PROTEIN

The results of cell viability assays showed that Cry1Ia38 -I116V protoxin and activated toxin have no cytotoxic activities against Sf21 cell line. No significant differences were observed between the percentage of viable cells after exposure to different concentrations of protoxin (p-value = 0.2821) and activated toxin (p-value = 0.2305) of Cry1Ia38-I116V protein (Figure 4.6). No morphological changes were observed in Sf21 cells exposing to the highest concentration (20 μ g/ml) of protoxin and activated Cry1Ia38-I116V protein (Fig. 4.7).

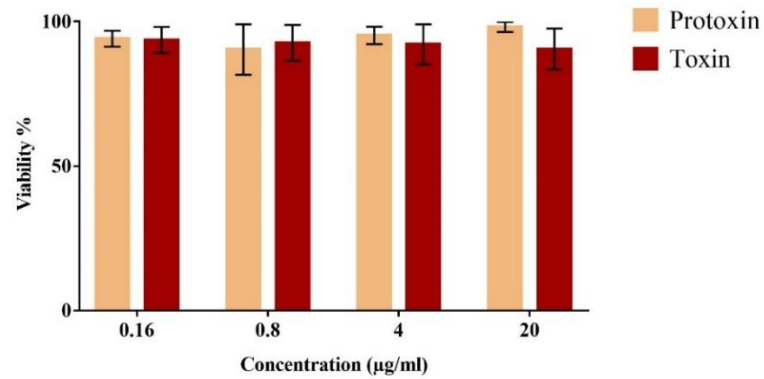


Fig. 4. 6. Susceptibility of Sf21 cells to protoxins and trypsin activated Cry1Ia38-I116V protein. Bars represent percentages of viability after 24 h of exposure to different concentration of Cry1Ia38-I116V protein. SE of the results from three different experiments were represented in each bar.

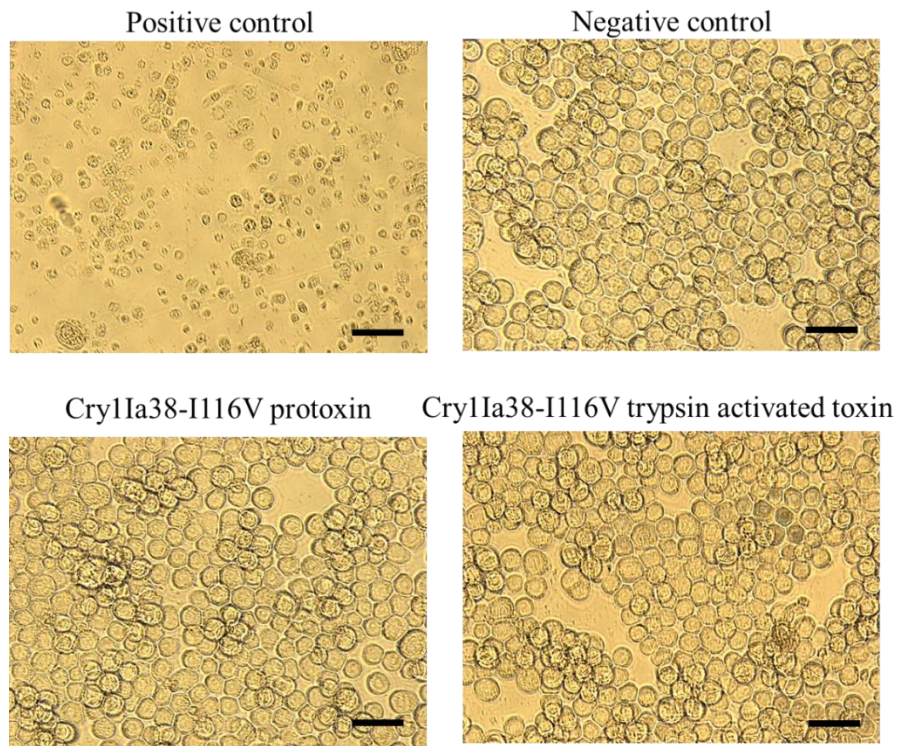


Fig. 4. 7. Sf21 cells after treatment with Cry1Ia38-I116V protoxin and activated toxins. Morphological changes recorded after 24 h of exposure to different concentrations of protein. Bars in the figure represent 50 µm.

4.3.8. EXPRESSION, PURIFICATION AND ACTIVATION OF CRY1IA7 PROTEIN

The expression of the Cry1Ia7 gene in *E. coli* BL21 (DE3) cells resulted in production of a protein with molecular weight of 80 kDa. After trypsin activation of 80 kDa protoxin, a stable core of 50 kDa, called activated toxin, was obtained (Fig. 4.8).

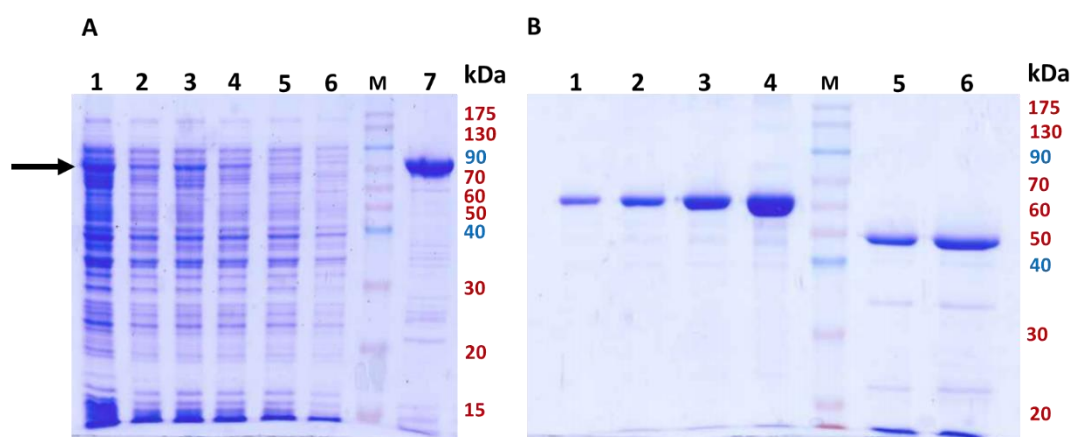


Fig. 4. 8. Expression, purification and activation of Cry1Ia7 protein. Panel A: Lanes 1-4: Protein expression in *E. coli* cells, Lanes 5 and 6: Flow thorough, M: Protein markers, Lane 7: Cry1Ia7 protein. Panel B; Lanes 1-4: Four different concentrations of the standard protein BSA (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml), M: Protein markers, Lanes 5 and 6 Activated, purified, and dialyzed Cry1Ia7 toxin. The arrow refers to the expression of Cry1Ia7 protoxin.

4.3.9. THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF CRY1IA7 TOXIN

Based on the bioassay results, Cry1Ia7 activated toxin was not highly toxic in the tested concentration of 1000 ng/cm² for first instar larvae of *O. nubilalis*, *G. molesta*, *M. brassicae* and *S. littoralis*. There was no significant difference between the susceptibility of the tested larvae to Cry1Ia7 activated toxin (p -value > 0.05). While the Cry1Ia7 protoxin was highly toxic for *G. molesta* and *O. nubilalis* first instar larvae (Table 4.3).

Table 4. 3. Toxicity of protoxin and trypsin activated Cry1Ia7 against lepidopteran first instar larvae (Mortality \pm standard error).

Cry1Ia7 protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm ²)	Activated toxin (1000 ng/cm ²)
<i>O. nubilalis</i>	90 \pm 5 ^{a1}	21 \pm 5
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	21 \pm 11
<i>M. brassicae</i>	- ²	9 \pm 6
<i>S. littoralis</i>	15 \pm 2 ^b	13 \pm 4

1) Statistics of one-way ANOVA analysis for each column data are included, and the analyses which rendered P values lower than 0.05 were followed by Tukey test. Different letters within each column represent statistical significant differences (Tukey test P-value\0.05) among different insect species used.

2) The sign (-) indicates not analyzed.

4.3.10. THE CYTOCIDAL ACTIVITY OF CRY1IA7 PROTEIN

The cytocidal activity of Cry1Ia7 toxin was assessed against two lepidopteran insect cell lines, Sf21 and Hi5. Results showed that there was no significant difference between percentage of viability of Sf21 and Hi5 cells after being exposed to Cry1Ia7 toxin for 16 and 24 hours (Fig. 4.9; A and B). However, after 48 hours of incubation of the tested cell lines with the highest concentration of toxin, 40% of the Sf21 and Hi5 cells lost their metabolic activity (Figure 4.9, C). Results indicate that Cry1Ia7 toxin has no significant cytocidal activity in the concentrations used for Sf21 and Hi5 cell lines.

The results of microscopic observation on the morphological changes of the cells exposed to Cry1Ia7 toxin show that, after 48 hours, Sf21 and Hi5 cells were affected by the highest concentration of the toxin. Destruction of the cell wall was evident in swollen and balloon-shaped cells (Fig. 4.10).

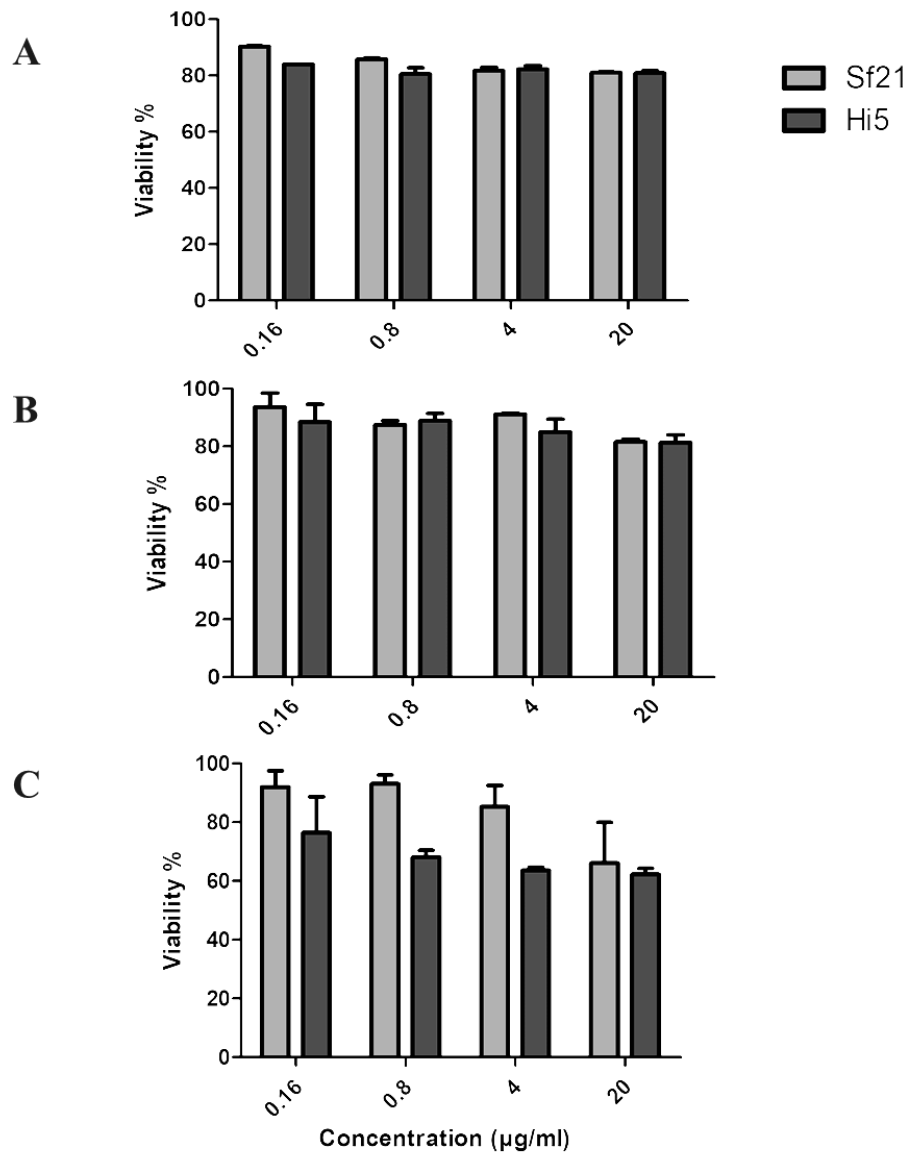


Fig. 4. 9. Susceptibility of Sf21 and Hi5 cells to trypsin activated Cry11a7 protein. Bars represent percentages of cell viability after exposure to different concentration of Cry11a7 protein. SE of the results from three different experiments were represented in each bar. The percentage of viable cells were measured after being subjected to Cry11a7 toxin for 16 hours (A), 24 hours (B) and 48 hours (C).

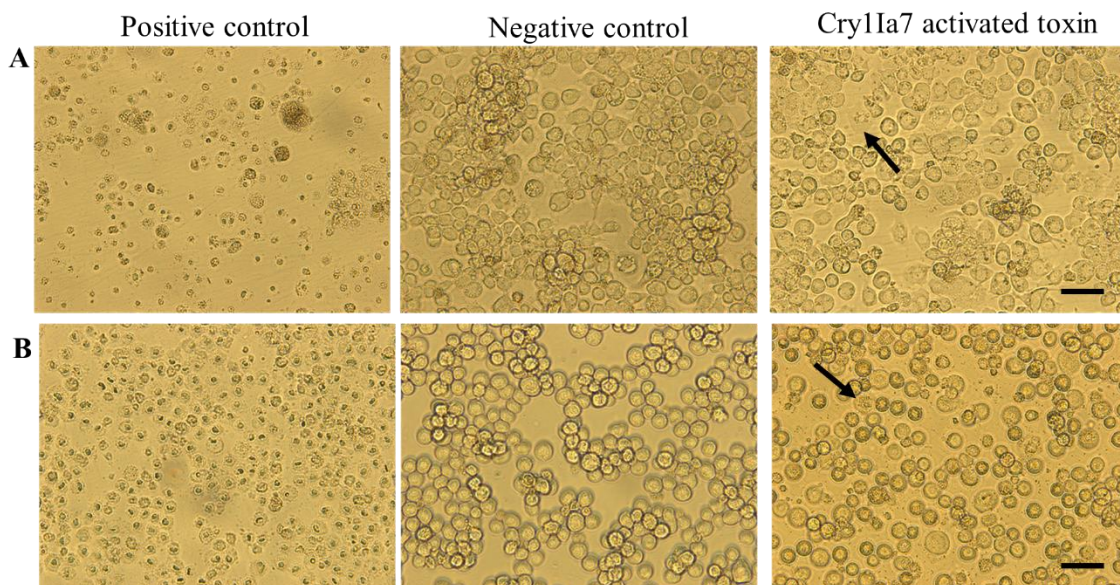


Fig. 4. 10. The morphological changes of Hi5 (A) and Sf21 (B) cells after exposure to the highest concentration (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of CryIIa7 activated toxin. Bars in the figure represent 50 μm . The black arrows point to the damaged cells.

As previously discussed, different strategies are being developed to deal with the resistance problems of insect pests to Bt-based insecticides. To maximize the effect of Bt toxins and to overcome the resistance or at least delay the resistance of pests, several toxins from Bt with different mode of action are commonly used in formulations based on Bt or in transgenic plants. But the important point is that so far, few Bt toxins have been identified that have a different mode of action. Therefore, the study of new *cry* genes for the production of recombinant bacterial strains and transgenic plants has a great importance. Since CryII proteins have a different mode of action comparing to other three-domain Cry proteins, they can be pyramided with other Bt toxins to reduce pest resistance.

Based on the result of this thesis, *cryIIa38* gene from *B. thuringiensis* IE-1 strain, was successfully cloned. The complete sequence of this gene encodes a protein of 720 amino acids with a length of 2160 nucleotides. The newly identified gene was sent to the Bt δ -

endotoxin Nomenclature Committee (<http://www.btnomenclature.info>) and assigned the name "Cry1Ia38".

Protoxin of all three studied proteins, Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7, had the same molecular weight, about 80 kDa. The estimated molecular weight is common for CryII family (Song et al., 2003; Ruiz de Escudero et al., 2006; Guo et al., 2009; Zhao et al. al. 2015). Also, trypsin activated toxin was studied in these three proteins, resulted a stable core with a molecular weight of 50 kDa. The three-dimensional structure of the three proteins was investigated and compared with the structure of other known Bt toxins, including Cry1Aa, Cry23 / 37, Cyt2Aa, and Vip2Aa (Fig. 4.12). The difference in amino acids sequences of the three proteins Cry1Ia38, Cry1Ia38 -I116V and Cry1Ia7 were shown in Figure 4.11.

Many of the CryII proteins have been identified and described, and their insecticidal activity against pests from several orders have been evaluated , including *Spodoptera spp.*, *Manduca sexta*, *Cydia pomonella*, *Agrotis ipsilon*, *Earias insulana*, *Plutella xylostella*, *Prays olea*, *Telchi licus licus*, *Bombyx mori*, *H. armigera*, *T. ni*, *Ostrinia spp.*, *H. zea*, *Pyrrhalta aenescens* , *Leguminivora glycinivorella*, *Epiphyas postvittana*, *Artogeia rapae*, *L. decemlineata*, *Anthonomus grandis* and *Tenebrio molitor* (Tailor et al., 1992; Koo et al., 1995; 1998; Choi et al., 2000; Tounsi et al. 2003; Song et al., 2003; Boncheva et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2006; Martins et al., 2007; Grossi-de-Sa et al., 2007; Guo et al., 2009; Dammak et al., 2010; Craveiro et al., 2010; Dammak et al., 2011; Guo et al., 2011; Bergamasco et al., 2013; Zhao et al., 2015; Shin et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018).

The bioassay results of the three studied proteins showed that activated toxin of all three proteins was highly toxic for *G. molesta* and *O. nubilalis* larvae. Also, *O. nubilalis* larvae showed a high susceptibility to Cry1Ia38 protoxin. In contrast, *S. exigua*, *S. littoralis*, *H. armigera* and *M. brassicae* were not highly susceptible to Cry1Ia proteins. The findings of these assays were supported by earlier studies pointing to the activity of Cry1Ie1 and Cry1Ie2 toxins, against *Ostrinia* species and the absence of susceptibility of *S. exigua* and *H. armigera* larvae to Cry1Ie toxins (Zhao et al., 2015). It is noteworthy that the insecticidal activity Cry1Ia protoxin was higher than that of activated toxin. The

insecticidal activity of protoxin, activated toxin (monomer) and Cry1Ie oligomers were investigated on *P. xylostella* larvae (Guo et al., 2009). Based on the bioassay results, LC₅₀ values were 14, 21 and 1400 micrograms per milliliter, respectively for protoxin, monomer and oligomer. As a result, Cry1Ie protoxin was the most toxic one for *P. xylostella* larvae (Guo et al., 2009). It has been demonstrated that Cry1Ab and Cry1Ac protoxins are toxic for resistant insect population comparing to their active toxins (Tabashnik et al., 2015). In the case of Cry1Ac toxin, it has also been reported that there is no significant difference between calculated LC₅₀ values for protoxin and Cry1Ac-activated toxin versus CF-203 cell line (Li et al., 2018). The results of SDS-PAGE and Western blot indicate that 130 kDa protoxins have been the cause of the death of CF-203 cells, and protoxin has not been converted to active toxin. It is also interesting that the two toxins Cry1Ia38 and Cry1Ia38-I116V exhibited different insecticidal activity despite the difference in only one amino acid.

Several studies have been performed on the insecticidal activity of CryII protein family, but there is no report of the cytotoxic activity of these toxins. In the present work, for the first time, the cytotoxic activity of the three CryIIa proteins was studied. Therefore, the results of the cytotoxic activity of CryIIa proteins were compared with the bioassay results of other studies. Previous studies showed that, CryIIa7, CryIIe1 and CryIIe2 were not toxic for *S. frugiperda* and *T. ni* larvae (Ruiz de Escudero et al., 2006; Zhao et al., 2015) similarly to present results. However, the susceptibility of *S. frugiperda* larvae and Sf21 or Hi5 cells to CryIIa, CryIIa10 and CryIIa12, in other studies, were contradictory with our results (Martins et al., 2007; Grossi-de-Sa et al., 2007; Bergamasco et al., 2013; Oliveora et al., 2016). The variation in the activity of CryII proteins could be due to differences in allele resulting in different proteins which finally affects the insecticidal activity. Moreover, the differences in the virulence of different CryII proteins, could be due to differences in susceptibility of tested insect pests in various studies (Hernández-Martinez et al., 2008).

Cry1Ia38	MKLKNQDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQNINHEDCLKMSEYENVEPFVSASTIQTGI	GIAGKILGTLGVPFAG	80
Cry1Ia38-I116V	MKLKNQDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQNINHEDCLKMSEYENVEPFVSASTIQTGI	GIAGKILGTLGVPFAG	80
Cry1Ia7	MKLKNPDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQNINHEDCLKISEYENVEPFVSASTIQTGIS	SIAGKILGTLGVPFAG	80
Cry1Ia38	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKISTYARNKALTDLKGLGDALAVYHDSLESWVGNRNNTRARSVVKS		160
Cry1Ia38-I116V	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKISTYARNKALTDLKGLGDALAVYHDSLESWVGNRNNTRARSVVKS		160
Cry1Ia7	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKISTYARNKALTDLKGLGDALAVYHESLESWVGNRKNTRARSVVKS		160
Cry1Ia38	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS		240
Cry1Ia38-I116V	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS		240
Cry1Ia7	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS		240
Cry1Ia38	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRDMTLMVLDLVALFPSYDTQMYPIKTTAQLTREVYTD AIGTVHPHPSFTSTTWYNNNAP		320
Cry1Ia38-I116V	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRDMTLMVLDLVALFPSYDTQMYPIKTTAQLTREVYTD AIGTVHPHPSFTSTTWYNNNAP		320
Cry1Ia7	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRKDMTLMVLDLVALFPSYDTLVYPIKTTSQLTREVYTD AIGTVHPNASFASTTWYNNNAP		320
Cry1Ia38	SFSAIEAAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLLSRWSNTQYMMNWGGHKLEFRTIGGTLNISTQGSTNTSINPVTL PFTSRDVYR		400
Cry1Ia38-I116V	SFSAIEAAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLLSRWSNTQYMMNWGGHKLEFRTIGGTLNISTQGSTNTSINPVTL PFTSRDVYR		400
Cry1Ia7	SFSTIESAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLLSRWSNTQYMMNWGGHRLLEFRTIGGM LNTSTQGSTNTSINPVTL PFTSRDVYR		400
Cry1Ia38	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQP NYESYSHRLSHIGLIS		480
Cry1Ia38-I116V	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQP NYESYSHRLSHIGLIS		480
Cry1Ia7	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQP NYESYSHRLSHIGLIS		480
Cry1Ia38	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRNTGTFGDIRVNINPPFAQR YR		560
Cry1Ia38-I116V	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRNTGTFGDIRVNINPPFAQR YR		560
Cry1Ia7	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRNTGTFGDIRVNINPPFAQR YR		560
Cry1Ia38	VRIRYASTTDLQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTTPFSELDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF		640
Cry1Ia38-I116V	VRIRYASTTDLQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTTPFSELDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF		640
Cry1Ia7	VRIRYASTTDIQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTTPFSESDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF		640
Cry1Ia38	VPVEVTYEA EYDFEKAQEKV TALFTSTNPRGLKTDVKDYHIDQVSNLVESSLDEFYLD EKRELFEIVKYAKQLHIERNM		719
Cry1Ia38-I116V	VPVEVTYEA EYDFEKAQEKV TALFTSTNPRGLKTDVKDYHIDQVSNLVESSLDEFYLD EKRELFEIVKYAKQLHIERNM		719
Cry1Ia7	VPVEVTYEA EYDFEKAQEKV TALFTSTNPRGLKTNVTEYHIDQVSNLVESSLNEFYLD EKRELFEIVKYAKQLHTGRNM		719

Fig. 4. 11. The alignment of the amino acid sequences of Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7 proteins. The amino acids shown in red indicate the differences in amino acids sequences (www.uniprot.org).

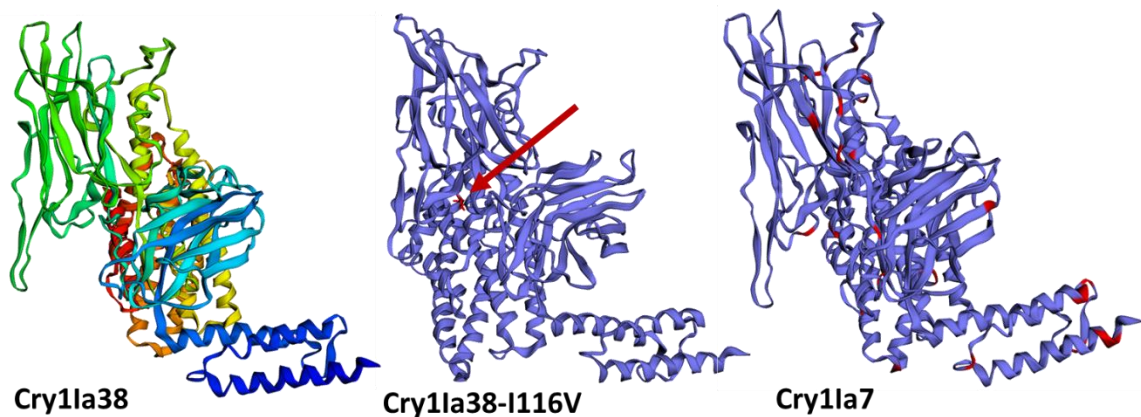
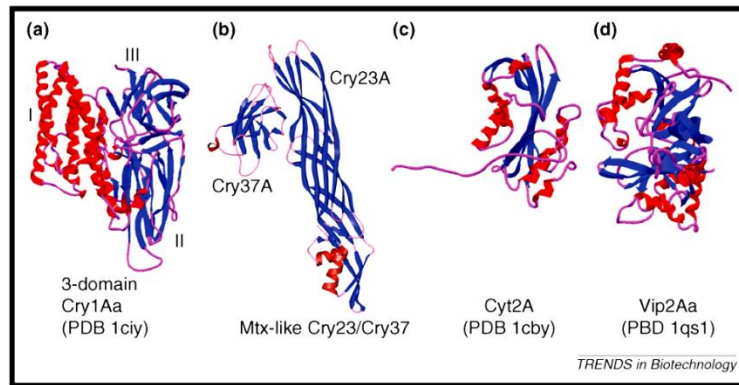


Fig. 4. 12. Comparison of the 3D structure of Bt toxins. The above image shows the structure of the 3D structure of known Bt toxins (Bravo and Soberón, 2008). (a) The Cry1Aa protein. b) Cry23Aa/Cry37Aa binary toxin, c) Cyt2A, and d) Vip2Aa toxin. The below image indicates the three-dimensional structures of the three used proteins in this thesis, Cry1Ia38, Cry1Ia38-I116V and Cry1Ia7. The difference in the sequence of amino acids is marked in red. In the image of the three-dimensional structure of the Cry1Ia3 -I116V toxin, the red arrow points to the amino acid number 116. Three-dimensional structures of Cry1Ia toxins were modeled using the Phyre2 software (Kelley et al., 2015).

Based on the results obtained in this chapter, the new Cry1Ia38 toxin was found toxic for *G. molesta* and *O. nubilalis* first instar larvae. Also, the slight differences in the nucleotide sequence of Cry1Ia38 resulted in significant differences in the activity of Cry1Ia38-I116V mutant and Cry1Ia7 protein. But it is noteworthy that the toxicity of Cry1Ia protoxins was

greater than the trypsin-activated toxins. CryII proteins, despite their distinctive and unique properties, are included in the CryI protein group. Therefore, for the upcoming chapter, two questions are arisen: 1. Do CryII proteins have the same mode of action as other three domain Cry proteins? Focusing on this fact that, do CryIIa proteins form oligomeric structures? And the second question is 2. Is there any association between oligomerization and insecticidal activity of CryIIa protein? The answers to these questions are given in the following chapter.

CHAPTER FIVE
ASSOCIATION BETWEEN OLIGOMERIZATION AND
INSECTICIDAL ACTIVITY OF *BACILLUS tHURINGIENSIS*
Cry1Ia TOXIN

5.1. INTRODUCTION

Insecticidal activity of Bt toxins relies on the ingestion of parasporal crystalline inclusions to reach to the midgut epithelium. Once ingested by the susceptible larvae, parasporal crystals dissolved by the pH conditions of the midgut and converted to protoxins. The solubilized protoxins are cleaved by host midgut proteases yielding protease resistant core. Toxin insertion leads to pore formation, cell lysis, disruption of midgut epithelial cells and eventually insect death (de Maagd et al., 2003; Bravo et al., 2007). According to the sequential binding model, after proteolytic activation of Cry1A proteins, monomers bind to the cadherin receptors that leads to conformational changes and proteolytic cleavage. This binding triggers the second proteolytic cleavage that leads to toxin oligomerization, membrane insertion and pore formation (Vachon et al., 2012). Oligomer formation of the Cry proteins prior to toxin insertion into membrane has been described as a major step in toxicity process of Bt toxins (Gomez et al., 2002). The sequential binding of Cry toxins to at least two receptor molecules resulting in oligomer formation, has been greatly investigated in the case of Cry1A toxins (Hara et al., 2003; Jiménez-Juárez et al., 2007; Arenas et al. 2010; Pardo-López et al., 2013).

Oligomerization has been studied in several wild type and mutant Bt toxins such as; Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ie, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Ca, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry64Aa1, Cyt1Aa, Sip, and Vip (Tingue et al., 2001; Rausell et al., 2004; Herrero et al., 2004; Pérez et al., 2007; Fabrick et al., 2009; Groulx et al., 2011; Carmona et al., 2011; López-Díaz et al., 2013; Khomkhum et al., 2015; Abe et al., 2017; Palma et al., 2017). It has been claimed that oligomer formation, as an intermediate responsible for pore formation, is a conserved mechanism for different Cry proteins (Rausell et al., 2004; Muñoz-Garay et al., 2009).

Among the characterized cry genes, the *cryII* gene family has unique traits: (a) these genes are usually silent in Bt strains but can be expressed in *E. coli* cultures, (b) CryII-type proteins do not accumulate in crystals, but because of their similar structure to other Cry1 proteins, were classified in this group, (c) CryII protoxins have a molecular weight of 70 to 81 kDa (usually, the molecular weight of Cry1 protoxins is about 130 kDa) and

(d) they are toxic for lepidopteran and coleopteran pests (Tailor et al., 1992; Choi et al., 2000).

Clear understanding of Bt toxins mode of action is critical for enhancing and sustaining their efficacy against pests. In the present work, for the first time, oligomer formation of Cry1Ia toxins, as an important step in the mode of action of Cry toxins in sequential binding model, has been examined. Indeed, Cry1I family proteins display several specific and remarkable characteristics including unique molecular weight of protoxins compare to the other members of Cry1 family and dual activity against lepidopteran and coleopteran pests (Tailor et al., 1992; Choi et al., 2000; Khorramnejad et al., 2018). In this chapter, the association between the formation of oligomeric structures and the insecticidal activity of Cry1Ia toxin was also investigated.

The binding behavior of Cry3A, Cry3B and Cry3C proteins and their ability to bind to receptors on the brush border membrane vesicles from Colorado potato beetle, *L. decemlineata*, were examined. Based on the results, all three Cry3 proteins have the same binding site and compete for the common binding sites. The formation of oligomeric structures was also studied in these proteins. Based on the obtained results, Cry3 toxins formed oligomeric structure similar to Cry1A toxins. Moreover, positive and direct correlation has been found between the oligomer formation and the pore formation by these proteins in the midgut of *L. decemlineata* (Rausell et al., 2004).

In the research performed by Likitvivatanavong et al. (2005), the formation of oligomeric structures and toxicity of Cry4Ba mutants and wild type were studied and compared. The mutants have been prepared by substitution of alanine with other amino acids in helix α -5 in domain I. All mutants produced a protein with a molecular weight of 130 kDa similar to the wild type. Insecticidal activity of the N183A mutant against the *Stegomyia aegypti* mosquito larvae was completely vanished. While insecticidal activity of the other four mutants was reduced significantly. Interestingly, the N183K mutant lost its ability to form oligomeric structure. Based on the results, the asparagine amino acid, located at position 183, plays a major role in toxicity and the formation of the oligomeric structures of the Cry4Ba protein.

Previous studies have shown that Cyt1Aa toxin increases the insecticidal activity of Cry11Aa toxin. Because Cyt1Aa toxin acts as a receptor bound to the membrane for Cry11Aa toxin. In the case of Cry toxins, the binding of toxin to the receptor induces the formation of oligomeric structures. As a result, it is expected that the binding of Cry11Aa toxin to Cyt1Aa toxin as a receptor will lead to the formation of Cry11Aa oligomers. According to the study carried out by Pérez et al. (2007), the binding of Cry11Aa toxin to Cyt1Aa toxin resulted in the formation of an oligomer and the formation of pores in the epithelial cells of target insect pest. Also, Cyt1Aa toxin has a synergistic role and reduces the resistance of pests to Cry11Aa toxin.

Silent *cryIIe* gene in Bt strains was expressed by Guo et al (2009), and cloned in *E. coli* BL21 cells. Bioassay results showed that the 84 kDa Cry1Ie protein was toxic for *P. xylostella*, *O. furnacalis* and *L. glycinivorella*. After expression and purification of Cry1Ie protoxin, activation was done using the trypsin enzyme, and active toxin monomers were obtained. Glutaraldehyde as a cross-linker was added to the resulting protein solution. Then the protein solution was separated by size-exclusion chromatography. Based on the obtained results from chromatography, monomers and oligomers of Cry1Ie proteins were detected and purified. The Cry1Ie oligomers were observed as dimers and aggregations larger than tetramers.

Different steps in the mode of action including receptor binding, oligomer formation and pore formation of Cry1Ab wild-type and eleven mutants have been studied (Rodríguez-Almazán et al., 2009). The insecticidal activity of eleven mutants was assessed against *M. sexta* and compared with that of wild-type. The mutations that occurred in helix α -4 of domain I of Cry1Ab toxin, completely eliminated the toxicity. These mutants lost their ability to bind to receptors and consequently oligomer formation. As a result, oligomerization seems to be an important and essential step in the toxicity of Cry toxins (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

The results of bioassays performed by Cry4Ba-E159K and Cry11Aa-V142D mutants against *Aedes aegypti* showed that the insecticidal activity of these mutants against the larvae has completely disappeared. Because these mutations lost their ability to form the oligomeric structures (Carmona et al., 2011).

It has been demonstrated that modified Cry1Ab protoxin has insecticidal activity towards resistant population of *M. sexta*. Also, oligomeric structures were observed in this modified protein (Gómez et al., 2014).

The mode of action of Cry1Ab toxin (wild-type) and the mutants based on receptor binding, oligomerization and pore formation were studied on CF-1 cell line. Cry1Ab mutants lost their insecticidal activity against *M. sexta* larvae and CF-1 cells. But a mutation in the helix α -1 of Cry1Ab toxin resulted in an increase in the toxicity of this toxin on CF-1 cells. This mutant is able to form oligomeric structure without binding to receptors (Portugal et al., 2014).

The interaction between Cry1Ac toxin and modified Cry1Ac toxin (Cry1AcMod) was evaluated against the midgut cells of *Pectinophora gossypiella* resistant and susceptible populations. The Cry1AcMod toxin has 56 amino acids less in N-terminal end of domain I (helix α -1) compare to the Cry1Ac. Based on the results, Cry1AcMod has the ability to form oligomeric structures without binding to the cadherin receptors. Moreover, the Cry1AcMod was 1,000 times more toxic for Cry1Ac toxin-resistant *P. gossypiella* larvae than Cry1Ac toxin. As a result, the resistance of *P. gossypiella* larvae to Cry1Ac toxin was due to reduced ability of the protein to bind to the receptor and to loss of the formation of oligomeric structures. The results of this study confirm the role of cadherin in the oligomerization of Cry toxins. Consequently, Cry1AcMod toxin can oligomerize and kill the host larvae without binding to the cadherin receptors, in resistant larvae that have mutated their cadherin (Ocelotl et al., 2015).

The Cry46Aa1 protein, also called Parasporin-2 (PS2), has the ability to form oligomeric structures after binding to Glycosyl Phosphatidyl Inositol-binding protein (GPI-binding proteins) receptors. It should be noted that Cry46Aa1 proteins have cytotoxic activity against human cancer cells (Abe et al., 2017).

Xu et al. (2018) showed that activation of Cry2Aa protoxin with midgut juice of *P. xylostella* larvae is essential for the insecticidal activity of this toxin. The mutants from Cry2Aa toxin, mutated in the four and five alpha helix, do not form oligomer, and their

toxicity have been severely affected against *P. xylostella* larvae. The findings of these researchers point to the importance of forming oligomeric structures in the Cry2Aa toxin.

Therefore, the formation of oligomeric structures in Cry1Ia toxin and the association between the formation of these structures and the toxicity of Cry1Ia toxin was considered as the hypothesis of this chapter.

5.2. MATERIALS AND METHODS

5.2.1 PREPARATION OF CRY1IA AND CRY1AB PROTEINS

Oligomerization of Cry1Ab in solution and membrane-bound conditions, small or large unilamellar vesicles, cadherin-like peptide (scFv73), cadherin fragment, brush border membrane vesicles, insect cell lines or fraction of cell membrane, has been confirmed in several studies (Rausell et al., 2004; Gómez et al., 2014; Portugal et al., 2014; Nair and Dean 2015; Tanaka et al., 2016). Accordingly, Cry1Ab toxin was selected as a model (control) to study and confirm the oligomer formation of Cry1Ia7 protein. Therefore, Cry toxins oligomerization was studied in two proteins, Cry1Ab and Cry1Ia7, from a same family structurally related to each other.

The Cry1Ab protein used in this study was obtained from *E. coli* GG094-208 recombinant strain donated by Dr. R.A. de Maagd (Wageningen University, Wageningen, Netherlands). Protein expression, extraction, purification, solubilization and activation were performed according to Sayyed et al. (2005). Briefly, *E. coli* cells were cultured in TB culture medium (KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM, pH 10.8, 21.6 g yeast extract and 0.36% glycerol, in one liter of water) containing 25 µg ampicillin per milliliter of culture medium at 37 ° C. Each gram of bacterial cells containing the expressed protein of Cry1Ab was mixed with three ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) and 800 µg of lysozyme enzyme. The DNA in the protein mixture was digested with 50 µg / ml DNase enzyme. The mixture was kept at 37 ° C for one hour.

After centrifugation at 40,000 $\times g$ for 40 minutes, the pellet containing Cry1Ab proteins was washed several times with the washing buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 1M NaCl). For solubilization of Cry1Ab protoxins, the solubilization buffer (50 mM Na₂CO₃ pH 10.0, 100 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol) was used for two hours at 37 °C with gentle agitation. The soluble protoxins of Cry1Ab was separated from other parts (non-soluble materials) by centrifugation at 158000 $\times g$ for 15 minutes. Activation of Cry1Ab protoxin was carried out by using the trypsin enzyme with a weight / weight ratio of ten mg of Cry1Ab protein to one mg of the trypsin enzyme at 37 °C for two hours. Purification of Cry1Ab activated toxin was performed by ion exchange chromatography using the MonoQ 5.5 column and in the ÄKTA 100 explorer system (GE Healthcare, United Kingdom). Initially, the buffer of Cry1Ab activated toxin was replaced by the dialysis buffer (20 mM Tris-HCl buffer at pH 9). The dialyzed protein was centrifuged at 16000 $\times g$ for 15 minutes at 4 °C. The obtained supernatant was filtered through 0.2 micrometer filter nylon membrane. The filtered protein was loaded in the HiTrap Q HP (GE Healthcare) column with the volume of 5 ml. Cry1Ab protein was separated and washed from the column at the slope of 20 to 70% with 20 mM Tris-HCl buffer and 1 M NaCl (pH 9.0). One milliliter of the column flow thorough was obtained and analyzed on a 12% SDS-PAGE gel.

As previously described, Cry1Ia protein was also taken from a Spanish Bt strain namely HU4-2. The protein expression, extraction, purification and activation of the Cry1Ia protein are described in 2.2.3 section.

At the end, the concentration of Cry1Ab and Cry1Ia active toxins was estimated by densitometry using TotalLab Quant program version 12.3, employing bovine serum albumin, as a standard protein.

5.2.2. INSECTS

The formation of oligomeric structures on different cell derived models, insect cell lines and BBMV was studied. For host selection we paid attention to different aspects: (1)

Oligomerization was investigated on different cell derived models; insect cell line and brush border membrane vesicles. (2) Due to dual activity of CryII proteins, different insect species from Lepidoptera and Coleoptera orders were employed in our study, including; *Ostrinia nubilalis* and *Lobesia botrana* neonates and cell line from *Spodoptera frugiperda* (Sf21) from lepidopteran pests and *Leptinotarsa decemlineata* neonates from coleopteran pests. (3) Susceptibility of the selected insect species to Cry1Ab and Cry1Ia toxins, had been taken into account to categorize the selected host into susceptible and non-susceptible (or tolerant) groups.

Two different lepidopteran species, *L. botrana* (Lep.: Tortricidae) and *O. nubilalis* Hübner (Lep.: Crambidae), and one coleopteran species, Colorado potato beetle (CPB) *L. decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) were used in this study. The insect species were reared on the artificial diet as described before (Lozzia and Manachini 2003; Ruiz de Escudero et al., 2007) and kept at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ with $70 \pm 5\%$ RH and a photoperiod of 16/8 h (light/dark).

Lepidopteran cell line, Sf21, from ovaries of fall armyworm *S. frugiperda* (Lep.: Noctuidea) was employed for oligomer formation assays. Sf21 cells were maintained on Grace's medium (Gibco® Life technologies™, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) in 25 cm² cell culture flask. Insect cell line was maintained under the conditions recommended by the supplier. Cell concentration was measured by countess automated cell counter (Invitrogen).

5.2.3. INSECT DISSECTION AND BBMV PREPARATION

Midguts were dissected from fifth-instar larvae of *O. nubilalis* and forth-instar larvae of *L. decemlineata*. The dissected midguts were rinsed in ice-cold MET buffer, 0.3 M mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris-HCl pH7.5, preserved in liquid nitrogen and kept at -80°C until use. Brush border membrane vesicle (BBMV) was purified from dissected midguts of last instar larvae of *O. nubilalis* and *L. decemlineata* and whole insect (last instar larvae) of *L. botrana*, by the differential magnesium precipitation method (Wolfersberger et al., 1987), as modified by Escriche et al., (1995). Purified BBMVs were

quantified by Bradford protein assay and stored at -80°C . In the case of the last-larvae of *L. botrana*, midgut was not dissected and BBMV was prepared from the whole larvae body because their very small size. In the case of *L. botrana*, the total larvae were mixed with nine times of MET buffer volume to the weight. The whole process of BBMV was made on ice. The large intestinal components that were not well homogenized were separated by centrifugation for 15 minutes at 4°C at $2500 \times g$. The supernatant was centrifuged again for 30 minutes at 4°C at $31000 \times g$. The resulting mixture was kept on ice for 15 minutes. The supernatant and pellet were separated by centrifugation for 15 minutes at 4°C and $2500 \times g$. The final sample was mixed, with 12 mM MET buffer. The 50 and 100 μl fractions of purified BBMV were stored in liquid nitrogen after concentration determination using Bradford method, and stored in a freezer at -80°C .

5.2.4 BIOTIN LABELLING

After the incubation of Cry1Ab and Cry1Ia7 proteins with structures derived from insect cells (BBMV and / or insect cell line), the proteins have to be visualized by western blot technique. For detecting the desired protein in western blot technique, specific antibody is needed. Another alternation is to label the desired protein with biotin. Therefore, in the case of the Cry1Ab protein, a polyclonal specific antibody available in the University of Valencia, Biotechnological Control of Pest Laboratory, was employed. However, to detect the Cry1Ia protein, due to the lack of specific anti-antibodies, Cry1Ia protein was labelled with biotin.

Biotin or vitamin B7, in fact, is a coenzyme for carboxylase enzymes that contribute to the formation of fatty acids, carbohydrates, and amino acids. In biochemistry, biotinylation is referred to as a process that biotin binds to a protein, nucleic acid, or other molecules. Biotinylation is a very accurate, specific, and fast process, and does not disrupt the natural activity of the molecules attached to, due to the small size of the biotin (molecular weight equal to 244.31 g / mol). Biotin is linked to streptavidin and avidin with a high affinity and specificity. In this method (biotin labelling) appropriate

concentration of biotin reagent was incubated with Cry1Ia protein. After two hours incubation time at room temperature, biotin molecules were attached to the Cry1Ia protein, which itself can bind a large number of streptavidin and avidin protein molecules, which ultimately led to increased sensitivity in detecting the desired protein.

The trypsin activated Cry1Ia was labeled with biotin using the Protein Biotinylation Kit, according to the manufacturer's instructions. Prior to labelling the protein, Cry1Ia activated toxin was dialyzed in sodium carbonate buffer (40 mM Na₂CO₃ pH 6.8) for one night at 4 °C. The dialyzed protein was centrifuged for 15 minutes at 16000 ×g, at 4 °C. The supernatant was collected and the concentration of protein was determined in the supernatant. According to the manufacturer's instructions, each 1000 micrograms of Cry1Ia protein was incubated with 40 µl of biotin label and kept at room temperature for one hour. Then, the labelled proteins were passed through the PD-10 desalting column (GE Healthcare), which was previously balanced with 1X phosphate saline buffer. The eluted fractions were quantified by NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo scientific), analysed by 12% SDS-PAGE and verified by western blot. Due to instability of Cry1Ia proteins in pHs lower than 11 and therefore loss of huge amount of protein in dialysis prior to biotin labelling, several fractions of biotinylated Cry1Ia were pooled and concentrated by using an Amicon Ultra-4 10K centrifugal filter device (Millipore).

5.2.5. STUDYING THE OLIGOMERIC STRUCTURES USING SF21 CELL LINE

For the oligomerization assays, after suspending confluent monolayer growing Sf21 cells in fresh Grace's medium without FBS, cell concentration was measured by countess automated cell counter. Then, 100 µl of cell suspension by the concentration of 2×10⁶ cells/ml were seeded into 96-well plates and incubated at 25°C at least for 30 min. Later, 20 µl of activated toxins (biotinylated Cry1Ia7 and unlabelled Cry1Ab) with the concentration of 0.2 µg/µl (final concentration of protein in each well is 0.03 µg/µl) were added to the cells and the plates were incubated for 3 hours at 25°C. The control wells received 20 µl of 50 mM carbonate buffer (pH 10.5). After the incubation time, the treated cells were collected and transferred to a clean micro-tube. The cells were pelleted by

centrifugation at 16,200 ×g, 4°C for 15 min. The supernatants containing unbound preteins, were kept to compare with the pellet in the western blot analysis. The proteins bound to the Sf21 cells were resuspended in 200 µl of 50 mM carbonate buffer pH 10 and recovered by centrifugation 45 min at 18,800 ×g. The supernatant was discarded and the final pellet was resuspended 10 µl of 50 mM carbonate buffer. The samples were heating at 50 °C for 3 min. Proteins were separated by SDS-PAGE 10% and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The membrane was blocked overnight in blocking buffer (PBST; 0.1% Tween 20 in phosphate-buffered saline) supplemented with 5% skimmed milk in gentle shaking and washed three times with PBST before incubation with antibodies. Cry1Ab protein was detected with polyclonal rabbit anti-Bt Cry1Ab/1Ac (1:10,000; 60 min) from Abraxis followed by secondary antibody (1:20,000; 60 min) coupled with horseradish peroxidase (HRP), whereas biotinylated Cry1Ia7 protein was detected by streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2,000; 60 min). Both Cry1Ab and Cry1Ia7 bound proteins were revealed with ECLTM prime western blotting detection reagent (GE Healthcare) and visualized with a chemiluminescence detection procedure (GE Healthcare), using an ImageQuant LAS400 image analyzer. Molecular weight marker used in all assays was precision plus protein dual colour standards (Bio-Rad, Carlsbad, CA). Each oligomerization assay was repeated at least three times.

5.2.6. STUDYING THE OLIGOMERIC STRUCTURES USING BBMV

Before start, BBMV aliquots were centrifuged for 10 min at 16,000 ×g and suspended in the appropriate volume of 50 mM Na₂CO₃ pH 10.5. The oligomerization assays with BBMVs were performed by incubating 2 µg of biotin labelled Cry1Ia7 and activated Cry1Ab toxins for one hour with 5 µg of *L. botrana* and *L. decemlineata* BBMVs and 20 µg of *O. nubilalis* BBMVs at 37°C in a total volume of 50 µl of alkaline buffer, pH 10.5. Proteolysis was stopped by adding 1 mM phenylmethylsulfoyl fluoride (PMSF). In the control, activated proteins were incubated in the absence of BBMVs under the same experimental conditions and also control samples contained only BBMVs were

considered in this experiment. After the incubation, BBMV were recovered by 45 min centrifugation at $18,400 \times g$ at 4°C . The supernatant containing monomers or unbound oligomers, was recovered to compare with the pellet in the gel. The obtained pellet was washed once with $100 \mu\text{l}$ ice-cold alkaline buffer ($50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$). The final BBMV pellets containing bound labelled Cry1Ia7 and/or unlabeled Cry1Ab, were resuspended in $10 \mu\text{l}$ of carbonate buffer. After incubating the samples for 3 min at 50°C , proteins were separated by 10% SDS-PAGE and blotted onto PVDF membrane. Associated proteins were visualized by western blot as mentioned in the previous section. These experiments were done a minimum of three times.

5.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1.3 FORMATION OF OLIGOMERIC STRUCTURES IN CRY1IA PROTEIN

As previously mentioned, Cry1I toxins have unique features amongst the family of three-domain Cry1 proteins. The complete and correct understanding of the performance of Cry1I toxins is necessary to increase their efficacy in plant pest control. In the sequential binding model, the formation of oligomeric structures prior to binding of toxin to receptors is known as the main step in the toxicity of three-domain Cry toxins. In this study, for the first time, the formation of oligomeric structure of Cry1I proteins incubated with the BBMVs from susceptible and non-susceptible host and also insect cell line, was determined by Western blot. Later, the oligomer formation of Cry1Ia toxin and its correlation with insecticidal activity of this protein were analyzed and compared with that of Cry1Ab toxin

5.3. PREPARATION OF CRY1IA AND CRY1AB PROTEINS

CryIIa toxin was expressed successfully in *E. coli* cells and a protein (protoxin) with a molecular weight of 80 kDa was obtained. After purification and activation of CryIIa protoxin with the trypsin enzyme, active toxin with a molecular weight of about 50 kDa was obtained. CryIAb activated toxin with trypsin enzyme was purified by chromatography using the ÄKTA explorer system. The quality and quantity of active and purified toxin CryIAb were investigated on a 12% SDS-PAGE gel (Figure 5.1). To determine the concentration of bands related to activated toxins CryIAb and CryIIa7, four different concentrations (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg / ml) of BSA as standard protein, were used. At the end, the concentration of CryIAb and CryIIa active toxins was estimated by densitometry using TotalLab Quant program version 12.3, employing bovine serum albumin, as a standard protein.

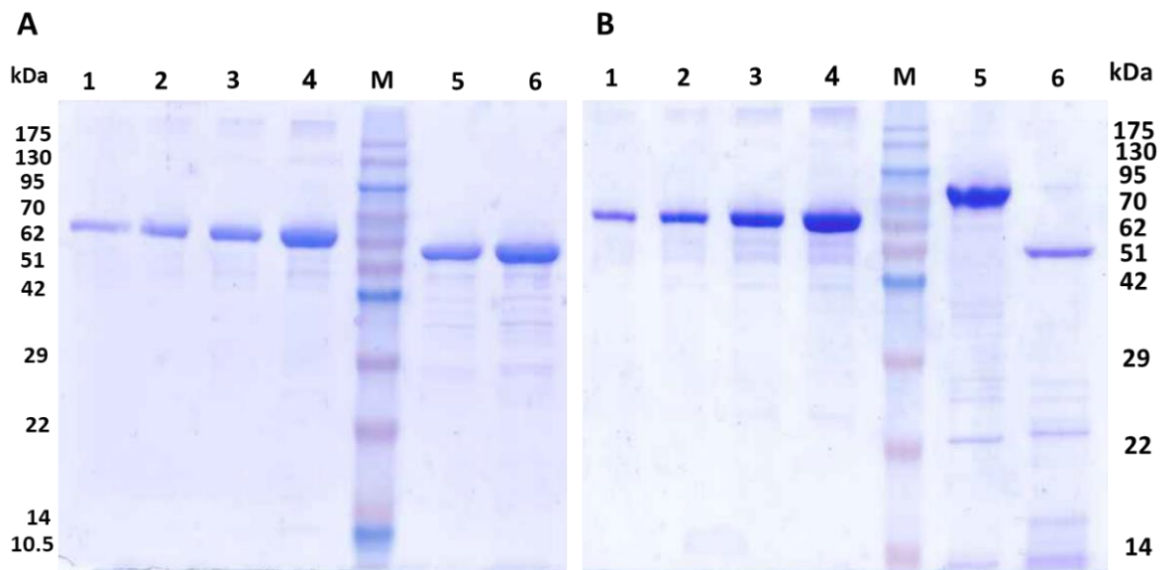


Fig. 5. 1. Expression and purification of Cry toxins. Panel A shows the active and purified CryIAb toxin; Lanes 1 to 4 show four different concentrations of BSA: 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml, M; color protein marker (Nippon genetics), lanes 5 and 6; active and purified CryIAb toxin. Panel B shows the active and purified CryIIa toxin; Lanes 1 to 4 show four different concentrations of BSA; M; color protein markers; Lanes 5 and 6 are CryIIa protoxin and activeed toxin.

5.3.3. BIOTIN LABELLING OF CRY1IA

After purification and trypsin activation the Cry1Ia protein, the resulting toxin was labeled by biotin. The accuracy of the Cry1Ia protein labeling was confirmed by Western blot (Fig. 5-2). The un-labelled Cry1Ia (without biotin binding) was loaded as a control in the gel. It was expected that no signal from this protein was detected after the western blot, as shown in Figure 5.2, the lane with the letter I (input). Lanes number one to eight refer to different fractions of the labelled protein that pass through the PD-10 column. Lanes two, three and four, which contain a relevant concentration of proteins marked with biotin, were used for oligomerization assays. The results of the Western blot showed that the Cry1Ia protein is successfully labelled with biotin.

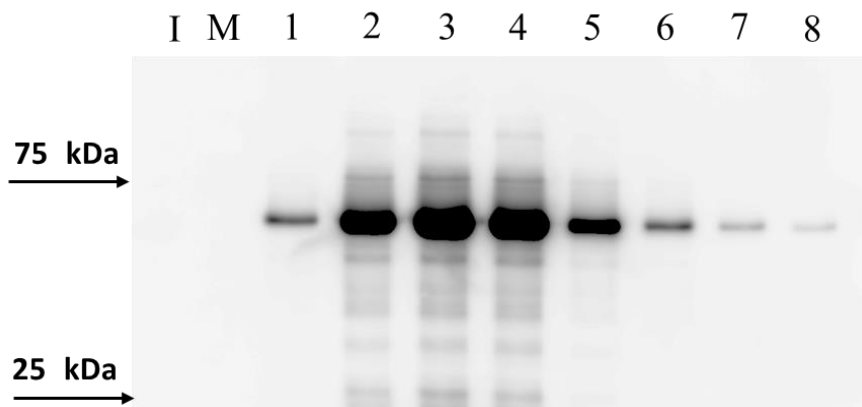


Fig. 5. 2. The result of Cry1Ia biotin labelling. The letter I; the input protein, the letter M; the molecular marker and the numbers from one to eight indicated elution of Cry1Ia7proteins.

5.3.4. FORMATION OF OLIGOMERIC STRUCTURES USING SF21 CELL LINE

Oligomerization was studied by western blot using Sf21 cells and BBMV's from susceptible and non-susceptible larvae to Cry1Ia7 toxin. Cry1Ab toxin was employed as a control in order to confirm and compare Cry1Ia7 oligomer formation results. As a result,

after the incubation of trypsin-activated Cry1Ab proteins with Sf21 cells, two main bands of approximately 60 and 250 kDa were clearly observed corresponding to Cry1Ab monomers and oligomers respectively. Whereas in the case of Cry1Ia7, monomeric structure found inserted into membrane pellet and no oligomer was detected. A portion monomeric structure of both Cry1Ab and Cry1Ia7 proteins found unbound to membrane and soluble in supernatant (Fig. 5.3). Some bands were observed in the lane of Sf21 cells without treating with toxin it may be due to the reaction of used antibodies with some proteins in the membrane of the Sf21 cells.

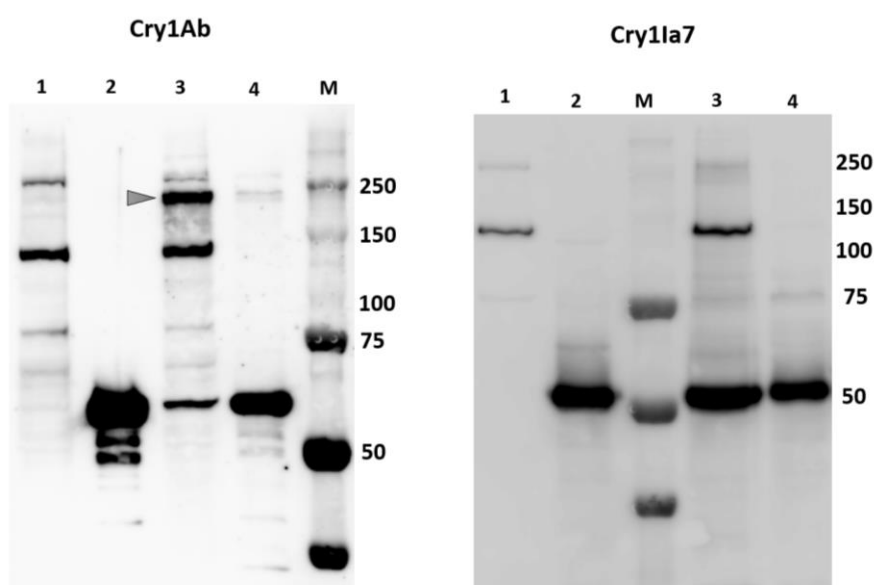


Fig. 5. 3. Oligomeric structure formation of Cry1Ab and Cry1Ia proteins by Sf21 cells. In both Cry1Ab and Cry1Ia7 panels, lanes 1 and 2 are controls receiving only Sf21 cells and input of tested protein, respectively. Lanes 3 indicate the membrane pellet with bound protein and lanes 4 are the supernatant containing soluble and unbound fraction of protein. Lanes M represent molecular mass marker (Precision Plus Protein Dual Color standards, Bio-Rad). Oligomeric structure of Cry1Ab was obtained after the incubation of Cry1Ab activated toxin with Sf21 cells. Cry1Ab oligomer is revealed as a 250 kDa band and a band of 60 kDa correspond to Cry1Ab monomers as observed in lane 3. The triangle points to Cry1Ab oligomers. No oligomer was detected for Cry1Ia7 after incubation with Sf21 cells, only a band of 50 kDa is observed in lane 3 that corresponds to Cry1Ia7 monomer.

5.3.3. FORMATION OF OLIGOMERIC STRUCTURES USING BBMV

To validate the oligomer formation protocol by using the BBMV, oligomeric structure of Cry1Ab incubating with *O. nubilalis* BBMVs, as a susceptible host, was determined. As a result, after incubation of trypsin activated Cry1Ab toxin with 20 µg of *O. nubilalis* BBMVs, a band with molecular weight of approximately 250 kDa reacted to polyclonal Cry1Ab antibody, was revealed as an oligomeric structure by western blot. While under the same experimental conditions, biotin labelled CryIIa did not oligomerize. The membrane-associated CryIIa toxin was detected as a faint signal of 50 kDa corresponding to CryIIa monomers (Fig. 5.4). The trypsin activated Cry1Ab and CryIIa7 toxins were recovered in soluble fraction as 60 and 50 kDa monomers, respectively.

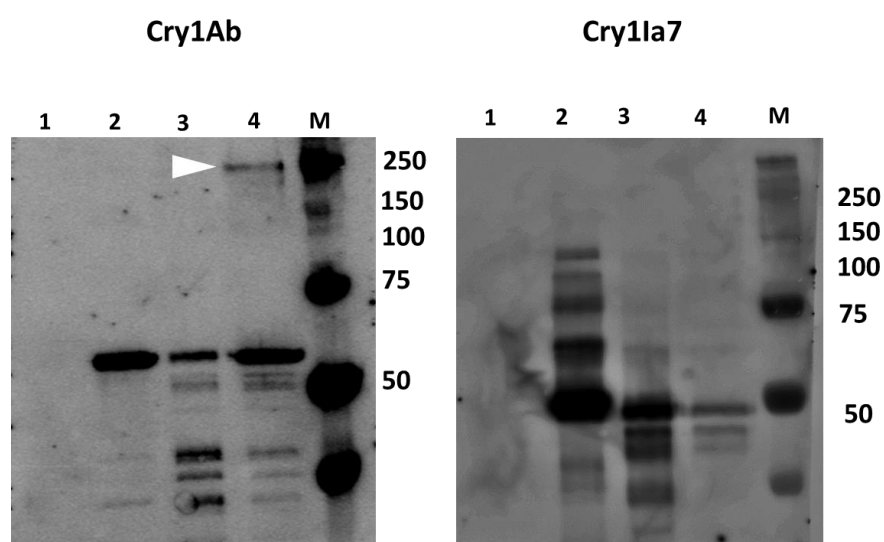


Fig. 5. 4. Oligomerization of Cry1Ab and CryIIa toxins in the presence of *O. nubilalis* BBMVs. Trypsin activated Cry1Ab and biotinylated CryIIa toxins with the final concentration of 0.04 µg/µl were incubated with 20 µg of BBMVs from *O. nubilalis*, separated by SDS-PAGE and revealed by western blot. In both panels, lanes 1 and 2 are controls with 20 µg *O. nubilalis* BBMVs and 200 ng of tested proteins as an input, respectively. Lanes 3 in both panels are the supernatant containing soluble and unbound monomers of Cry1Ab and CryIIa. Lanes 4 represent the membrane pellet with bound protein, which for Cry1Ab two bands of 250 and 60 kDa were detected but for CryIIa only a faint band of 50 kDa was revealed by western blot using streptavidin-conjugated horseradish peroxidase. Lanes M correspond to molecular mass marker. Triangle is pointing to Cry1Ab oligomeric structures.

In the next step, the importance of oligomerization in the CryIIa toxin toxicity was investigated after incubating the protein with two sensitive host membrane fragments from two different strains. *L. botrana* was selected as a sensitive host for both CryIAb and CryIIa proteins. After incubating two micrograms of labeled CryIIa protein with five micrograms of BBMV from *L. botrana*, no oligomeric structure attached to the membrane was found in the pellet. While under similar conditions significant amounts of CryIAb oligomers were detected. In the supernatant, soluble monomers were observed for both proteins (Fig. 5.5). It is noteworthy that in this experiment, the signal related CryIIa monomer attached to the membrane is much stronger than CryIAb monomer attached to the membrane, indicating that the CryIIa monomer is further attached to the membrane. Also, in some repetitions of this experiment, an extremely weak band with a molecular weight of more than 250 kDa was observed irregularly during the incubation of the CryIIa toxin with BBMV from *L. botrana*. This oligomer represents structures with more than five to six units, which is larger than typical tetramer templates. On the other hand, CryIIa toxin, unlike CryIAb, was processed proteolytically with proteases associated with *L. botrana* cell membrane fragments. In the sense that, by increasing the concentration of BBMV from 5 µg to 20 µg, a weak signal of monomers was detected.

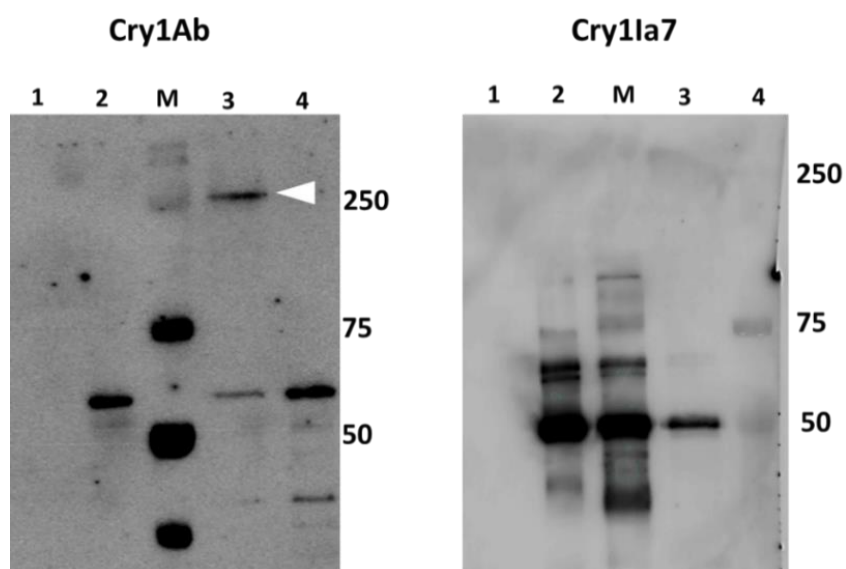


Fig. 5. 5. Oligomer formation of Cry1Ab and Cry1Ia toxins in the presence of *L. botrana* BBMVs. Cry1Ab and Cry1Ia activate proteins were incubated with 5 µg of BBMVs from *L. botrana*. In both panels, lanes 1 show 5 µg *L. botrana* BBMVs without toxin and lanes 2 represent control of activated proteins (200 ng). Lanes 3 indicate the membrane pellet with bound protein and lanes 4 are the supernatant containing soluble and unbound proteins. Lanes M correspond to molecular mass marker. Cry1Ab oligomers were clearly observed in lane 3 of Cry1Ab panel as a band of 250 kDa. In contrast, Cry1Ia did not form oligomer after incubation with BBMVs from susceptible host and only a band of 50 kDa corresponding to monomers, was revealed by western blot in lane 3. Triangle is pointing to Cry1Ab oligomeric structures.

As previously mentioned, Due to dual activity of CryII proteins towards lepidopteran and coleopteran hosts, *L. decemlineata* was employed as a coleopteran susceptible host to study CryIIa oligomer formation. Interestingly, Cry1Ab and Cry1Ia oligomeric structures formed after interaction of both toxins with BBMVs from *L. decemlineata* and subsequent centrifugation. In addition to considerable amount of Cry1Ia oligomers, high molecular mass aggregates were observed after the incubation of biotin labelled Cry1Ia with CPB BBMVs. For Cry1Ab, except monomeric and oligomeric structures bound into *L. decemlineata* BBMVs, a band of approximately 150 kDa was detected corresponding to Cry1Ab dimers. Surprisingly, detectable amount of oligomers was found in the

supernatant of both proteins. It seems that *L. decemlineata* BBMV's triggered oligomerization of Cry1Ab and Cry1Ia toxins in solution. (Fig. 5.6).

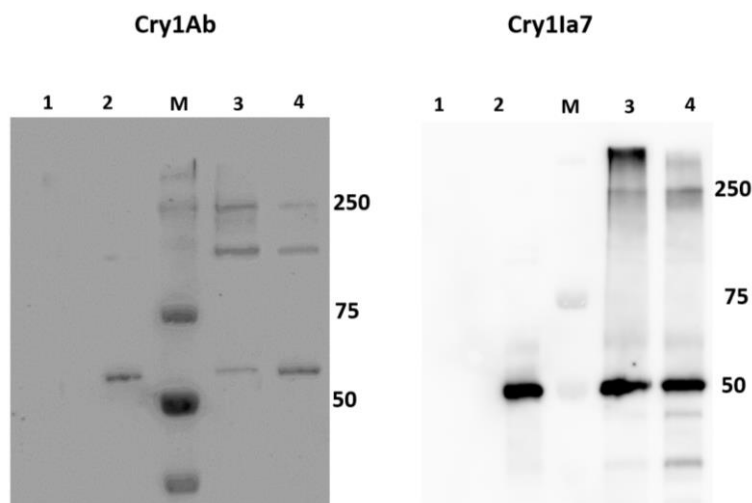


Fig. 5. 6. Oligomer formation of Cry1Ab and Cry1Ia toxins in the presence of *L. decemlineata* BBMV's. The amount of 2 μ g of trypsin activated Cry1Ab and Cry1Ia were incubated with 5 μ g of BBMV's from *L. decemlineata*. In both panels, lanes 1 show 5 μ g BBMV's without toxin and lanes 2 represent control of activated proteins (200 ng). Lanes 3 indicate the membrane pellet with bound protein and lanes 4 are the supernatant containing soluble and unbound proteins. Lanes M correspond to molecular mass marker. A 250 kDa band showing Cry1Ab and Cry1Ia oligomers, was observed in lanes 3 and 4 of both panels. In lanes 3 and 4 of Cry1Ab panel, besides monomeric and oligomeric structures, a band of less than 150 kDa corresponding to Cry1Ab dimers, was detected. In lane 3 of Cry1Ia panel, an aggregates with molecular weight of higher than 250 kDa was observed.

CryII proteins have three-domain structure similar to other Cry proteins, therefore, it seems that, despite the unique features of CryII proteins (accumulation in crystals, the low molecular weight of protoxins, dual activity for lepidopteran and coleopteran pests), CryII proteins have the same mode of action of other CryI proteins. The purpose of this section of the dissertation was to study the formation of the oligomer and the association between oligomerization and the toxicity of Cry1Ia toxin.

Several studies have been done on the importance and necessity of the oligomer formation in mode of action and insecticidal activity of Cry Bt toxins (Tingue et al., 2001; Likitvivanavong et al., 2005; Jiménez-Juárez et al., 2007; Portugal et al., 2014). The results of previous researches indicate that toxicity of Cry toxins mutants, which do not have the ability to form oligomeric structures, has been greatly reduced (Tingue et al., 2001; Herrero et al., 2004; Jiménez -Juárez et al., 2007). It has also been shown that Cry1A mutants that lost their insecticidal activity do not have the ability to form oligomeric structures (Rodríguez-Almazán et al., 2009; Portugal et al., 2014).

In the present study, the oligomerization of CryIIa protein incubated with the BBMV and insect cell line were determined for the first time by western blot analysis. There is only one report about oligomeric structure of CryII toxins that, Guo and coworkers (2009) have analyzed oligomerization of CryIIe by size-exclusion chromatography using glutaraldehyde as a cross-linker. According to their results, CryIIe proteins form oligomers composed of dimers and also aggregates of bigger than tetramers. While according to our results, CryIIa formed oligomers as high molecular mass aggregates, only following incubation with *L. decemlineata* BBMVs.

As far as we concern this is the first study comparing the oligomer formation of Bt toxins in contact with BBMVs from susceptible and non-susceptible hosts. Previous studies of Bt toxins oligomerization have focused on susceptible and resistance populations of the same insect (Ocelotl et al., 2017). According to their results, great association has been found between resistance and reduced oligomerization (Ocelotl et al., 2015). Moreover, several studies reported that oligomerization plays a crucial role in insecticidal activity of Cry toxins (Tingue et al., 2001; Likitvivanavong et al., 2005; Jiménez-Juárez et al., 2007; Portugal et al., 2014), in a way that, Cry protein mutants that showed severely decreased toxicity, did not form oligomers (Herrero et al., 2004; Jiménez-Juárez et al., 2007). Likewise, the Cry1A mutants that lost their toxicity compare to wild-type, are incapable of oligomerization and pore formation (Rodríguez-Almazán et al., 2009; Portugal et al., 2014). The mutation of Cry1Ab and Cry1Ac toxins affected the toxin oligomerization and also toxicity towards *M. sexta*. In the pellet fraction of these two mutants, only monomeric structures were detected showing serious defect in oligomer

formation and consequently in insecticidal activity (Tingue et al., 2001). Previous researches have demonstrated that, Cry1A engineered toxins, whether mutants or modified toxins, which retained their insecticidal activity, are able to form oligomeric structure. Though according to our results, surprisingly Cry1Ab forms oligomer regardless to its host susceptibility as it oligomerized after incubation with *O. nubilalis* and *L. botrana* BBMV (susceptible insects) and *L. decemlineata* BBMV and Sf21 cells (non-susceptible insects). Observation of Cry1Ab oligomeric structure after incubation with non-susceptible hosts, can be explained by reversible binding of oligomers to vesicles or inefficient insertion to membrane. Since, following several washes of *M. sexta* BBMV incubated with Cry1Ab, only monomers were recovered after centrifugation (Pacheco et al., 2009). Similarly to biotinylated Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac, that after several steps of washing the BBMV, monomeric structure of toxins were detected by western blot (Vachon et al., 2012). So, it seems that toxin insertion into membrane did not occur efficiently. Therefore, the necessity of oligomerization in insecticidal activity of Cry1Ab toxin is questionable. The same phenomena has observed regarding to Cry1Aa7 oligomerization. Following incubation of *L. botrana* BBMV, as a susceptible host, with biotin labelled Cry1Aa, no oligomeric structure was detected. Biotinylation cannot interfere oligomerization, as it has been tested in this study that biotin labelled Cry1Ab formed oligomers after incubation with *O. nubilalis* BBMV similar to unlabeled toxin (data not shown). Furthermore, performing bioassay with full-length toxin, monomeric and oligomeric structures of Cry1Ie protein against *Plutella xylostella* larvae indicated significantly lower insecticidal activity for oligomers compare to both monomers and full-length Cry1Ie (Guo et al., 2009). Thus, in our study, we could not provide convincing association between insecticidal activity and oligomerization of Cry1Ab and Cry1Aa toxins.

According to our experiments, Cry1Aa toxin was processed by *L. botrana* brush border membrane associated proteases. Because by increasing the BBMV concentration, the oligomer concentration decreased and at the highest concentration, 20 µg of BBMV, monomeric and oligomeric structures were completely processed. This result is in agreement with decreasing the amount of Cry1Ca oligomers by increasing the concentration of *S. exigua* and *M. sexta* BBMV reported by Herrero et al., (2004).

According to their oligomerization assay, incubation of Cry1Ca protoxin with 10 µg of *S. exigua* BBMV was enough to completely activate the protoxin and reducing at the same time the amount of the oligomer.

The oligomeric structure of Cry1Ab toxin was mainly found in the membrane pellet according to our results and previous reports. Though in the case of *L. decemlineata* BBMVs, Cry1Ab oligomers were detected in the soluble supernatant. Similarly to helix α -4 mutants of Cry1Ab that oligomers were detected in the soluble fraction in contrast to Cry1Ab wild-type (Rodríguez-Almazán et al., 2009). These toxins with mutation in domain I, which is involved in membrane insertion and pore formation, lost drastically their insecticidal activity. Similarly to our result that the oligomeric structures of Cry1Ab (after incubation with BBMVs from CPB), found in supernatant, strongly suggesting that these oligomers are incapable to insert into membrane and form pores, resulted in the loss of toxicity.

Monomeric structures of Cry1Ab and Cry1Ia, a band of 60 and 50 kDa respectively, were observed in lane corresponding to membrane pellet regardless to the presence of bound oligomers. Ocelotl and coworkers (2015) have claimed that these monomers are likely disassemble oligomers, or in the case of Cry1Ia, monomer inserted into membrane.

Ultimately, according to our findings, Cry1Ab toxin formed oligomers in contact with all the tested BBMVs whether from susceptible or from non-susceptible insect midguts and cells. Cry1Ia toxin formed oligomers only after incubation with *L. decemlineata* BBMVs (coleopteran susceptible host) and no Cry1Ia oligomeric structure found following incubation with Lepidopteran BBMVs and cell line regardless to its susceptibility. Hence, sequential binding model of Bt toxins mode of action, followed by toxin oligomerization, may not be thoroughly generalized for all Cry family members. It seems that oligomerization as an important step in sequential binding model may not be attributable to Cry1Ia mode of action.

In summary, the results obtained in this section of the dissertation indicate that Cry1Ab toxin formed oligomers after being incubated with fragments of susceptible and non-susceptible host cells. While in the case of Cry1Ia toxin only oligomeric structures were

formed after incubating the protein with a coleopteran susceptible host, *L. decemlineata*, and no oligomer was formed after the protein was exposed to susceptible and non-susceptible lepidopteran hosts. Therefore, in the mode of action of Cry toxins, based on the sequential binding model, the formation of an oligomer cannot be generalized for all Cry toxins and all host pests. Based on the results of this chapter, the formation of an oligomer is an important, but not necessarily essential step, for the Cry1Ia toxin toxicity.

Based on the obtained results, Cry1Ia proteins due to their different mode of action can be pyramided with other Cry toxins to increase the efficiency of Bt based products and Bt crops and also to manage the pest resistance problems. So far according to our obtained results, three Bt strains of AzLp, IE-2 and IP-2 strains and also novel *cryIIa38* gene showed great potential for controlling lepidopteran insect pests. So these Bt strains and a novel gene can be considered to be used Bt-based bio-pesticides. However, before recommending the use of AzLp, IE-2 and IP-2 strains and Cry1Ia38 toxin, in controlling lepidopteran pests, it was question whether the bacterial strains provides antimicrobial activity against other plant pathogens including fungi and bacteria. In other words, do our selected Bt strains also have the ability to control plant pathogens during pest management? In the following chapter, we tried to provide an answer to this question.

CHAPTER SIX

EVALUATION OF Bt STRAINS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

6.1. INTRODUCTION

Formerly, only the insecticidal properties of *B. thuringiensis* attracted extensive attention. However, in recent years, the roles of Bt strains in plant disease control, antibiotic action of Bt strains, plant growth promoting activities, induction of systemic resistance in plant and plant colonization have received considerable attention. There are evidences of an antibiotic action of spores and crystals of Bt strains on phytopathogenic fungi and bacteria. Finding a specific, easily degradable and low cost Bt-based formulation as an alternative to chemical pesticides, for controlling both insect pests and plant diseases, would be highly valuable in biological control

The antifungal activity of five Bt strains which their insecticidal activity had been proven previously, was assessed against *Fusarium roseum* var. *sambucinum* (Safdi et al., 2001). The five selected Bt strains did not have the ability to control the pathogenic fungus *in vitro*. While *in vivo*, the disease was controlled between 41% and 52%.

Antimicrobial activity of endotoxins and proteins with low molecular weight (33 to 36 kDa) from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* has been proven (Yudina et al., 2003). In a study performed by Dong et al. (2004), Gram-positive bacterium, Bt, disrupted the signalling systems of quorum sensing of the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora*, which severely reduces the pathogenicity of *E. carotovora*. All seven Bt strains studied by Dong and co-workers (2004) could effectively control the soft rot disease on potato tubers.

According to Kim et al. (2004), the CMB26 Bt strain produces a lipopeptide that has anti-fungal activity against the anthracnose agent, the *Colletotrichum gloeosporioides* fungus.

Proteins derived from strains *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* with molecular weights of 34 and 36 kDa had antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* and growth inhibition for *Streptomyces chrysomallus* (Revina et al., 2005).

The chitinase enzyme from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* inhibits the mycelial growth of the *Aspergillus niger*, which produces black mold on onions and almonds (Driss et al.,

2005). The apple cultivars treated with Bt strains were resistant to soft rot caused by *E. carotovora* (Zhang et al. 2007).

Bt strains used in the study of Choi et al. (2007) showed a high fungal activity against barley and cucumber powdery mildew and insecticidal activity against *P. xylostella* and *A. aegypti*. The antifungal activity of *B. thuringiensis* GS1 strain was investigated against *R. solani* fungus. The transplantation of the bacterial culture significantly inhibited mycelial growth of the pathogenic fungus (Dong-Jun et al., 2012).

In colonies of the fungus *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* affected by the endotoxin of *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, the growth rate and sporulation rate were significantly decreased and changes in the shape and colour of the fungal colonies were evident. In the study of the protective effect of δ -endotoxin on tomato fruits against *Fusarium* fungi during storage, it was found that the late blight disease was significantly reduced in the fruits with early fungal damage (Kamenek et al. 2012).

In the research performed by Mohammad et al. (2013), the mycelial growth of the *Rhizoctonia solani* fungus decreased significantly after inoculation with different strains from Bt, Bt HD-1 and Bt HD-203. Also, the inoculation of cotton seedlings with *R. solani*, previously treated with a mixture of spores and crystals of Bt, showed that not only the severity of fungal disease severely decreased, but also the growth of root and cotton buds significantly increased.

The KB1 endophyte Bt strain isolated from the *Arabidopsis thaliana* root extract, strongly increased the resistance in tomato plants to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* (Hong et al., 2015).

The chitinase activity of *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DMS-2803 strain was studied against *C. gloeosporioides* fungi. The results showed that the main antifungal activity of this strain from Bt was related to the endo-chitinase enzyme (Fuente-Salcido et al., 2016).

Antifungal activity of 137 Bt strains against five pathogenic fungi: *Aspergillus niger*, *Colletotricum* sp., *Monilia* sp., *Thielaviopsis* sp. and *Fusarium* sp., and four bacterial pathogens of *Staphylococcus aureus* wild-type (SM) and methicillin-resistant strains

(RM), and two Gram-negative *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were investigated (Djenane et al., 2017). Based on the results, almost all selected strains (135 out of 137 strains) had antifungal activity against at least one of the selected fungi. In the case of antibacterial activity, only 29.9% of the selected Bt strains were active against at least one of the selected pathogenic bacteria.

Bt strains used in the study of Hollensteiner et al. (2017) have the ability to inhibit the mycelial growth of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* fungi. All Bt strains showed an antagonistic effect on *V. dahliae* fungus.

The hypothesis in this chapter of the thesis was that Iranian Bt strains have antimicrobial activity against plant pathogens.

6.2. MATERIALS AND METHODS

In this section, the antimicrobial activity of toxins and seven selected Bt strains were studied on plant pathogenic agents. To investigate the possible antifungal activity of Bt strains, *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici*, was prepared by Plant Protection Department of University of Tehran. Antibacterial activity of Bt toxin was studied on *Erwinia* sp. plant pathogen bacterium, kindly prepared by the section of Plant Pathology, Department of Plant Protection of Urmia University.

6.2.1. THE EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY

The antifungal activity of selected Bt strains against *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici*, was studied. The effect of Bt strains was studied directly and indirectly. In indirect way, the presence of endo- and exo-chitinase genes, enzymes for hydrolysing chitin, which are the main source of antifungal activity of Bt strains, were investigated. Also, in direct effect, the effect of toxin and bacterial cells on the growth of *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* was studied

6.2.1.1. POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETECT CHITINASE GENES

The genomic DNA of Bt strains was extracted as described in chapter two. Subsequently, suitable primers (Table 6.1) for amplification of endo- and exo-chitinase genes were ordered from Sigma-Aldrich (Djenane et al., 2017). The presence of endo- and exo-chitinase genes were investigated in seven selected Bt strains. The reaction mixture and the PCR thermal condition were prepared according to the following tables (table 6.2 and 6.3). Polymerase chain reaction products were examined on a 1% agarose gel and the nucleotide sequences of the amplified fragments were determined by StabVida Company.

Table 6. 1. Used primers for amplification of endo- and exo-chitinase genes

Product size (bp)	T _m (°C)	Primer sequence (5'-3')	Target gene	Primer
1997	50	ATTCACACTGCTATTACTATC	Endo-chitinase	Chit (f)
	68.7	TGACGGCATTTTAAAAGTTCGGC		Chit (r)
1083	50.2	GATGTTAAACAGGTTCAA	Exo-chitinase	Chit36 (f)
	52.9	TTATTTTTGCAAGGAAAG		Chit36 (r)

Table 6. 2. Amounts and concentrations of consumed materials in amplification of chitinase genes

Components	Initial concentration	Used volume (μ l)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/ μ l	1	U/ μ l 0.04
dNTPs mix	mM 10	1	mM 0.4
Forward primer	μ M 10	1	μ M 0.4
Reverse primer	μ M 10	1	μ M 0.4
Template DNA	ng/ μ l 100	1	ng/ μ l 4
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

Table 6. 3. PCR condition for amplification of chitinase genes

Cycle step	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	4 min	1
Denaturation	94	40 sec	
Annealing	50	1 min	35
Extension	72	1-2 min (60 sec / 1Kbp)	
Final extension	72	10 min	1

6.2.1.2. DUAL CULTURE METHOD

Antifungal activity of Bt strains was investigated by using dual culture method (Knaak et al., 2007), with some modifications. The tested fungus, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* was cultured on a Potato Dextrose Agar (PDA) medium for seven days at 28 $^{\circ}$ C. The fungal plugs with six millimetres diameter were made *Fusarium* cultures. Bt strains were grown in Nutrient Agar medium and bacterial plugs were provided with six millimetres

diameter from bacterial culture that contained only one single Bt colony. The Dual culture method is the concept of cultivating fungi and bacteria in one plate, under appropriate conditions for growth of the fungus. The fungal and bacterial plugs was transferred to a petri dish containing PDA medium. The fungal plug was then transferred to the centre of the culture medium, and then three bacterial plugs, each of which belonged to one Bt strain, were radially placed at a distance of 2.5 cm from the centre of the petri dish. The fourth position in the petri dish was considered blank as the negative control, to record the highest growth rate of the fungus. In this test, HD1 Bt strain was used as reference or standard strain. Petri dishes were kept at 28 °C for seven days. Then, the radial growth of the fungus in the face of bacterial strains was measured by comparison with the control.

6.2.2. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BT STRAINS

The antibacterial activity of selected Bt strains was studied against *Erwinia* sp. based on disk diffusion method. The Bt strains were cultured on Nutrient Agar medium and stored at 29 °C for 48 hours. Then, bacterial suspensions of *Erwinia* sp. with a concentration of 10^8 CFU/ml was prepared as an inoculum for the preparation of lawn culture. For culturing *Erwinia* sp. based on lawn culture, 100 µl of the bacterial suspension prepared and spread on the surface of the Nutrient Agar medium, the suspension was uniformly seeded at the culture medium. Different bacterial plugs of the selected Bt strains were prepared and transferred under sterile conditions radially to a petri dish. As in the previous section, one position on the plate was kept as blank until the detection of maximal growth of *Erwinia* spp. The prepared petri dishes were kept at 29 °C for 48 hours. The bacterial growth rate was measured in the presence of Bt strains and compared with the control.

6.3. RESULTS AND DISCUSSION

Finding a Bt based formulation, toxic to plant pests and pathogens, can be easily degradable into the environment and has a suitable production cost, as a substitute for chemical insecticides would be valuable in biological control of insect pests and phytopathogens (plant pests and disease). As a result, in this section of the dissertation,

regarding to finding suitable Bt strains with a wide range of insecticidal activity against Lepidopteran pests, the antimicrobial activity of the selected Bt strains have been determined.

6.3.1. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF Bt STRAINS

Antifungal activity of selected Bt strains was assessed against fungal phytopathogen *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. The antifungal activity of Bt strains was investigated in two ways: 1. Spore and crystal plugs of different Bt strains and 2. Toxins of selected Bt strain were used. The results showed that seven selected Bt strains did not show antifungal activity in dual culture method against *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. So that the growth radius of the fungus was studied in seven strains of Bt and compared with negative control and standard Bt strain. In the case of negative control, no bacterial was incorporated to the maximum growth radius of the fungus *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* and compared with the radius of fungal growth in the Bt strains. The results indicated that there was no significant difference between the growth radius of the fungus in the negative control with the treatments (Fig. 6.1). Similarly, the growth of the fungus in the standard strain, HD-1, was similar to that of the selected Bt strains. In this way, the seven selected Bt strains did not show antifungal activity against the tested pythopathogen, *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*.

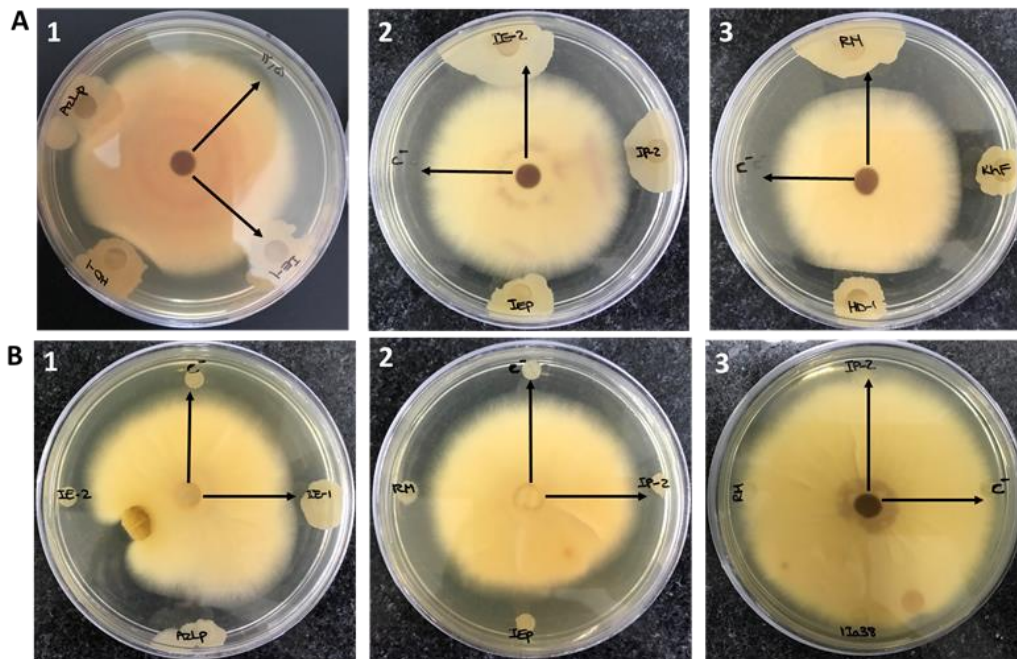


Fig. 6. 1. Antifungal activity of Bt strains. Panel A: Antifungal activity of bacterial plug containing spores and crystals. Panel B: Antifungal activity of toxins of different selected Bt strains. Images A1, A2, A3, B1, B2, and B3 refer to seven different strains of Bt and negative control.

In the previous studies, the antifungal activity of different Bt strains was assessed against different phytopathogenic fungi. Accordingly, different results from the antifungal activity of Bt strains were obtained, obviously our results are in agreement with those research studies that did not find any antifungal activity in their selected Bt strains and in contrast to the studies reported the antifungal activity. But it is noteworthy to mention that, in the most of studies, the antifungal activity has been reported from the examined Bt strains. As an example, in the research performed by Safdi et al. (2001), five Bt strains, previously proven to have insecticidal activity towards different insect pests, were used to control *F. reseau* var. *sambucinum*. As a result, the selected Bt strains did not have the ability to control the pathogenic fungus *in vitro*. While *in vivo*, the soft rot disease was controlled between 41% and 52% on potato tubers. Also, amongst the 30 Bt strains studied by Gomaa (2012), only one Bt strain namely, NM101-19 Bt strain, showed

antifungal activity due to high activity of chitinase enzyme. Therefore, the mentioned Bt strain (NM101-19) has been selected as a candidate for biological control of plant diseases due to its potential for destroying the cell wall of the plant pathogenic fungi. In addition, some fungal colonies of *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* were treated with δ -endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. In these fungal colonies the growth and sporulation rates were significantly decreased and the changes in the shape and colour of the fungal colonies were completely evident. As well, the δ -endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* effectively protected tomato fruits from soft rot disease during the storage time. So treating the tomatoes with δ -endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* prevent the prevalence of infection (Kamenek et al. 2012). In another study, the antifungal activity of 137 Bt strains was investigated against five pathogenic fungi (Djenane et al., 2017). Selected pathogenic fungi included *Aspergillus niger*, *Colletotricum* sp., *Monilia* sp., *Thielaviopsis* sp. and *Fusarium* sp. It is noteworthy that, contrary to the results obtained in this thesis, almost all selected strains (135 out of 137 strains) had antifungal activity against at least one of the selected fungi. The highest antifungal activity was observed in *A. niger* fungus, so that 77.4% of Bt strains inhibited the growth of this fungus. The lowest antifungal activity is also found in *Fusarium* sp. reported.

On the other hand, chitinase enzyme is one of the most important antifungal agents in different Bt strains. Different Bt strains with the ability of producing chitinase enzyme showed high antifungal activity against *F. roseum* var. *sambucinum*, *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizoctonia* sp., *F. oxysporum*, *Urocystis tritici*, *F. verticillioides* and *B. cinerea* (Salehi Jouzani et al., 2017). As a result, in this work, specific primers were employed for amplification of endochitinase and exochitinase genes in selected Bt strains. The amplification of endo-chitinase gene was positive in the three Bt strains of AzLp, IE-2 and IP-2, and the exo-chitinase gene was found in five strains IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp (Fig. 6.2).

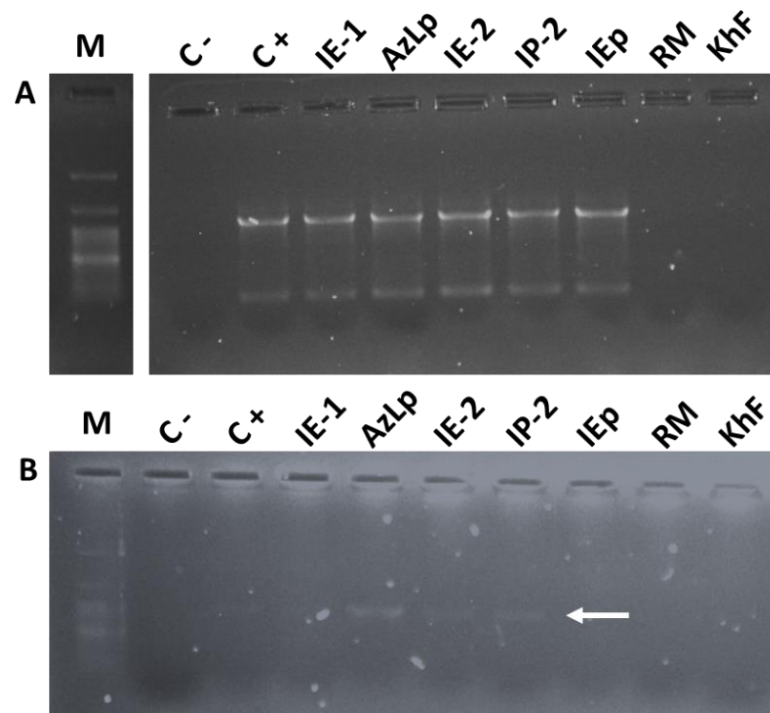


Fig. 6. 2. The amplification of endo-chitinase and exo-chitinase genes in seven *Bt* strains. Panel A: refers to the amplification of part of the exo-chitinase gene with a 1083 bp length, and panel B illustrates the amplification of endo-chitinase gene with the length of 1997 bp. The letter M, molecular marker, C-, negative control, C+, positive control, and other lanes refer to different *Bt* strains.

In the study of Djenane et al. (2017), exo-chitinase and endo-chitinase genes were investigated in 137 *Bt* strains. The result is that the presence of the endo-chitinase gene in 82 strains and the exo-chitinase gene in 66 *Bt* strains were confirmed. The presence of both genes was detected in 43.8% of the studied strains. In our study, there was no association between the presence of chitinase genes and the range of antifungal activity. Because, none of the seven examined strains showed antifungal activity against *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. While, positive correlation between the presence of chitinase genes and the antifungal activity of the studied *Bt* strains were found by Djenane et al., (2017).

6.3.2. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF Bt STRAINS

The antibacterial activity of selected Bt strains was studied against *Erwinia* sp. Based on the results, no inhibitory effect was observed from the studied Bt strains against *Erwinia* sp. (Fig. 6.3). For the standard strain, HD-1, a similar situation was observed. In the sense that none of the selected Bt strains showed antibacterial activity against *Erwinia* sp.

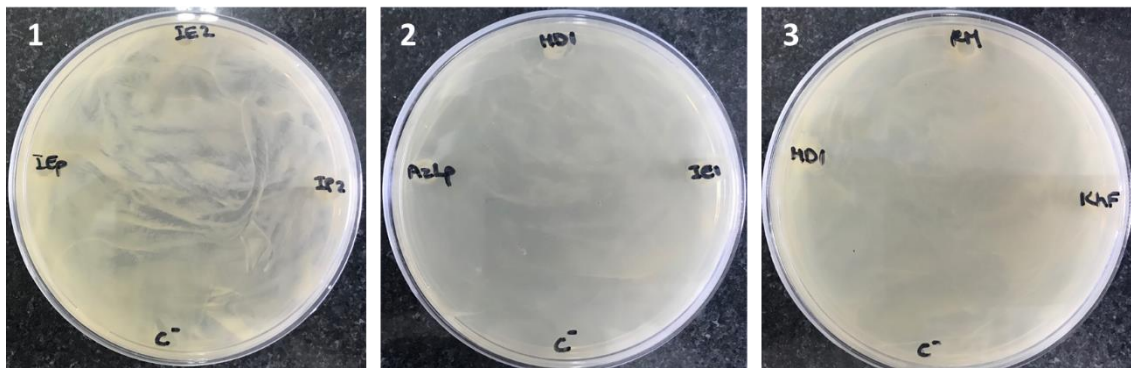


Fig. 6. 3. Antibacterial activity of Bt strains. Figures 1, 2 and 3 refer to seven different Bt strains and negative control.

It has been demonstrated that different Bt strains have antibacterial activity against different plant pathogens. The results of previous research on the antibacterial activity of different Bt strains suggest that Bt strains are able to disturb the quorum sensing of Gram negative bacterium, *E. carotovora*, therefore these Bt strains have the ability to reduce the pathogenicity of *E. carotovora* (Dong et al., 2004; Zhang et al., 2007). The antibacterial activity of Bt strains against four bacterial pathogens including two Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* wild-type (SM) and methicillin resistant strain (RM), and two Gram-negative bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated (Djenane et al., 2017). Of the 137 Bt strains, 41 strains were active against at least one of the selected bacteria. Based on the results of Djenane and co-workers (2017) the antibacterial activity was detected in 30 Bt strains against *S. aureus* SM, 27 Bt strains on *S. aureus* RM, 20 Bt strains against *E. coli* and 10 Bt strains on *P. aeruginosa*.

The reason for not observing antimicrobial activity (antifungal and antibacterial) in the studied Bt strains in this thesis, can be related to the origin of these strains. Because it has

been claimed that Bt strains isolated from soil, dust, stored products and herbs, are more closely associated with the microbial communities in their habitat, therefore they have the potential for antimicrobial activity. While, five Bt strains of IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp used in this study were isolated from infected and dead larvae, and only two strains RM and KhF were isolated from the soil.

CHAPTER SEVEN

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN TOMATO PLANTS IN RESPONSE TO Bt STRAIN

7.1. INTRODUCTION

The results of the previous studies point to the role of Bt in stimulating plant growth through the production of plant hormones, such as auxins, or by acting on the balance of plant ethylene, increasing mineral nutrition. The biocontrol activity of Bt strains is accomplished owing to the production of bacteriocins, autolysins, lactonases, siderophores, β -1,3-glucanase, chitinases, antibiotics and hydrogen cyanide. Moreover, there are several researches about the roles of Bt strain regarding to the protection of plant against abiotic stresses, antimicrobial activity against fungi and bacterial phytopathogens, siderophore production, chitinase production and induction of systemic resistance in plants (Raddadi et al., 2008; Goes et al., 2012).

On the other hand, regarding to the interaction of plant and Bt, experimental evidences show that the bacterium has the ability to transfer and move vertically in the plant, colonize and present it in the form of active (metabolically active) in the plants (Bizzarri and Bishop 2007, 2008; Maduell et al., 2008; Parca et al., 2012; Vidal-Quist et al., 2013; García-Suárez et al., 2017).

Some species of *Bacillus* genus, with endophytic properties, have several benefits to the plant, including protection of plants against phytopathogens, insects and nematodes, induction of systemic resistance and stimulation of plant growth without causing any damage to the environment. Some species of *Bacillus* genus namely; *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. pumilus* and *B. licheniformis* are among the most widely used species of *Bacillus* species in agriculture (Lopes et al., 2018).

The most important role of the mentioned bacteria is to protect the plant against an attack by plant pathogens. Because during the pathogen invasions to the plant, various reactive

oxygen species (ROS), such as superoxide anions ($O_2\bullet^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($OH\bullet$) are produced. These reactive oxygen species are produced by cytoplasmic enzymes, enzymes bound to the membrane or extracellular enzymes that are involved in reduction reactions (Greene et al., 2002). To prevent possible damage of these reactive oxygen species, plant cells have several anti-oxidant enzymes and non-enzymatic parameters that make reactive oxygen non-toxic. Under stress conditions, the formation and elimination of reactive oxygenates becomes equilibrium. However, some biotic and abiotic stresses such as pathogens, increased light energy, drought and low temperatures increase the production of reactive oxygen species, which leads to cell damage and inactivity of enzymes. Finally, if the concentration of reactive oxygen is increased, cell death occurs as the system does not have the ability to detoxify the ROS. Several enzymes have been found to be involved in the metabolism of reactive oxygen species, following a pathologic attack on plants. Meanwhile, superoxide dismutase enzymes (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), guaiac peroxidase (GPX; EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) are of particular importance. These enzymes prevent the loss of plant cell integrity due to reactive oxygen species during plant-pathogenic interactions (Bolwell et al., 2002; Mittler 2002). The excessive production of reactive oxygenates during oxidative reactions is part of the response of plant cells to pathogens. The relationship between the formation of reactive oxygen species and the increased activity of the enzymes involved in their metabolism, under the influence of host plant defense responses to the attack of pathogens, is found in many plants (Table 7.1) and reviewed elsewhere (Wojtaszek 1997).

Table 7. 1. Response of different plants to pathogens

Plant	Pathogen	Observation	Reference
Plant-fungus interactions			
Dark red kidney bean	<i>Colletotrichum lindemuthianu</i> galactoglucomannan	Accumulation of free radicals and cell death	Anderson et al., 1991
Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	Increased peroxidase activity	Vera-Estrella et al., 1992
Carrot protoplasts	<i>Pythium aphanidermatum</i> secreted compounds	None	Bach et al., 1993
Cotton	<i>Verticillium dahliae</i>	H ₂ O ₂ production, heterogeneity in oxidative processes	Davis et al., 1993
Parsley	<i>P. megasperma</i> pure glycoprotein	H ₂ O ₂ production	Nurnberger et al., 1994
Tobacco	<i>P. parasitica</i> Crude cell wall	Salicylic acid enhances the oxidative burst.	Bottin et al., 1994
Potato tuber discs	<i>Phytophthora</i> zoospores or hyphal wall components	•O ₂ ⁻ production	Foyer et al., 1994
French bean	<i>C. lindemuthianum</i> crude cell wall, chitin or chitosan oligomers	Alkalization of apoplast	Bolwell et al., 1995
Rice	N-Acetylchitoplignosaccharides	Accumulation of free radicals	Kuchitsu et al., 1995
Rose	<i>Phytophthora</i> sp. Crude cell wall	production H ₂ O ₂	Auh and Murphy 1995
Tomato cotyledons	<i>C. fulvum</i>	•O ₂ ⁻ production	May et al., 1996

Continued Table 7.1. Response of different plants to pathogens

Plant	Pathogen	Observation	Reference
Plant-bacterium interactions			
White clover	<i>Pseudomonas corrugate</i> cells	H ₂ O ₂ production	Devlin and Gustine 1992
Tobacco	<i>Erwinia amylovora</i> cells	Not identified	Baker et al., 1993
Soybean	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	H ₂ O ₂ production and cell death	Levine et al., 1994
Tobacco	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Normal phase of ROS production, but no cell death observed.	Glazener et al., 1996
Tomato and Tobacco	<i>Ralstonia solanacearum</i>	H ₂ O ₂ and free radicals production	Flores-Cruz and Allen 2009
Tomato	<i>R. solanacearum</i>	H ₂ O ₂ production	Mandal et al., 2011
Plant-virus interactions			
Tobacco leaf discs	Tobacco mosaic virus	•O ₂ ⁻ observation	Doke and Ohashi 1988

Results of spraying of *B. subtilis* AUBS1 strain on rice plant significantly decrease the disease of rice pods by increasing the activity level of PAL and CAT enzymes (Jayaraj et al., 2004).

The effect of *B. subtilis* strain on the activity of the cucumber plant defence system for the control of *Fusarium* wilt disease, by Chen et al. (2010). The highest levels of peroxidase activity in cucumber were observed when the plant was inoculated with *B. subtilis* bacteria.

The effect of inoculation of corn with different species of *Bacillus* including *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*, on growth, osmotic pressure and antioxidant status of corn have been studied (Vardhalajula et al., 2011). The results indicated that under the influence of *Bacillus* species, plant biomass, relative water content and leaf water potential increased. Inoculation of corn with bacteria specifically *Bacillus* species resulted in increased proline, carbohydrates and free amino acids contents, and reduced the activity of antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase, catalase and glutathione peroxidase. The result of inoculating the corn plant with *Bacillus* spp showed the physiological response of plant, these responses could reduce the negative effects of drought stress on corn.

In the study of Armada et al. (2015), several physiological parameters were measured in corn grown under drought stress, treated and untreated with Bt suspensions. The measured parameters included plant growth, photosynthesis efficiency, food content, oxidative lipid degradation, proline accumulation and other antioxidant compounds. Under drought stress, inoculation of corn with Bt increased the accumulation of nutrition in the plant significantly. In general, inoculation of corn under drought stress, with Bt, increased growth, increased nutrition and improved physiological conditions of the plant. However, there was no significant difference in proline concentration in normal and untreated plants with Bt.

When the French lavender plant *Lavandula dentata* is treated under drought stress with different microorganisms, including five species of mycorrhizal fungi and Bt, it could overcome oxidative destructive reactions. Particularly when inoculated with Bt bacteria, it fights more effectively with drought stress through anti-oxidant mechanisms. In other words, antioxidant defence in Bt-treated plants, by increasing the activity of the catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase enzymes, leads to the reduction of free oxygen radicals (Armada et al., 2016). Therefore, in seventh chapter of this thesis the effect of spore and crystal mixture of Bt strain on tomato plants was studied at the cellular level focussing on the anti-oxidant status.

7.2. MATERIALS AND METHODS

7.2.1. GROWING THE TOMATO PLANTS

Seeds of tomato plant cultivar Sultan were grown in autoclaved soil of a mixture of cocopeat and perlite. Tomato seedlings were transferred to plastic pots after two weeks. A total of 96 tomato pots were prepared for this section of the research. The pots were kept in the research greenhouse of the Department of Plant Protection (Agricultural Entomology section) under controlled and appropriate conditions. Five-week-old tomato plants were inoculated with Bt suspension.

7.2.2. INOCULATION OF TOMATO AND SOIL WITH Bt SUSPENSION

The lepidopteran highly toxic Bt strain, AzLp strain, was selected for performing this experiment. AzLp Bt strain was grown on Nutrient Agar (NA) medium and incubated at 29 ° C for four days. Then, the grown bacterial colonies on NA plates were transferred to a clean micro tube (1.5 ml) containing sterile distilled water by sterile loop, under sterile conditions. The resulting mixture was well vortexed to obtain a homogenous suspension of spore and crystal mixture. The concentration of Bt suspension was determined by of haemocytometer (counting-chamber device), and the concentration of 10^8 spores/ml was prepared. The inoculation of tomato plants with Bt suspensions was carried out by spraying on phylloplane and inoculating the soil around the root (rhizosphere). To inoculate the phylloplane, firstly, the pot soil was completely covered with several layers of cellophane to prevent the penetration of suspensions sprayed on the phylloplane into the soil (Fig. 7.1). Then, the Bt suspension was completely sprayed on the plant with a hand sprayer on the plant. Spraying on the phylloplane was continued until the observation of runoff. For soil treatment, five millilitres of suspension from AzLp strain were inoculated into the soil around the root. In the case of controls, the same volume of suspension, sterilized distilled water was sprayed on the phylloplane, or added to the soil

around the root. As a result, in this experiment, two treatments of rhizosphere and phylloplane as well as two controls were considered in three replications.



Fig. 7. 1. Pots of tomato plants where the surface of the soil is covered with cellophane.

7.2.3. SAMPLING

Eight different time intervals were considered for collecting the leaf samples from tomato plants. So, two hours after spraying the Bt suspension on the phylloplane of the plant (after air drying the suspension), the time was taken as zero, then at 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 15 days leaf samples were collected after inoculation of plants and soil. Different time intervals were selected base on the required time for performing bioassay experiments with toxin or mixture of spore and crystal of Bt strains. At each selected time, two treatments and two controls were considered. All the experiment was repeated three times. At the time of sampling in each of the eight selective time periods, 12 pots were transferred to the laboratory. In each sampling period, the leaves of the tomato plant were cut and transferred to crucible (a ceramic container). Liquid nitrogen was added to the cut leaves, and well-ground to obtain a light powder from the leaves. Then, the dried leaves of each treatment or control were transferred to a labelled Falcon tube (named after treatment or control and date) and stored at -80°C until use.

7.2.4. STUDYING THE ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC PARAMETERS

The studied enzymatic parameters included enzyme activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), guaiacotic peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lysis (PAL). For non-enzymatic parameters, protein content, total phenolic content, soluble carbohydrates and proline were considered. Activity of hydrogen peroxide degrading enzymes was carried out using the following formula:

$$\text{Enzyme activity} = (\Delta\text{OD} \times L \times V_t \times \text{df}) / (\epsilon \times I \times T \times V_s)$$

In this formula, ΔOD ; the difference between the optical density at the first and the last reading time; L ; the H_2O_2 coefficient in the equation; V_t ; the final volume of the reaction; df ; the diluent factor; ϵ ; the molecular absorption coefficient or the coefficient of extinction I ; the distance passed by light thorough the solution, T ; the time and V_s ; the sample size.

The activity of other enzymes was calculated using the following formula: $(\text{Time min} \times \text{volume of extracted enzyme ml}) / (\text{concentration of produced product } \mu\text{mol} / \text{ml} \times \text{final volume of reaction ml}) = \text{enzyme activity}$.

The unit of enzyme activity calculated by this formula is $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

7.2.4.1. ACTIVITY OF THE CATALASE ENZYME

The amount of 0.5 g of tomato leaves was weighed and homogenized in one millilitre of 50 mM phosphate buffer with pH 6.8. The obtained homogenous solution was centrifuged at $13000 \times g$ for 15 minutes at 4°C . The supernatant was used as an enzyme extract for catalase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes.

The activity of the CAT enzyme was determined by measuring the rate of disappearing or vanishing of hydrogen peroxide, H_2O_2 , at a wavelength of 240 nm (Aebi 1984). The

activity of catalase enzyme was measured for three minutes, with absorbance reading at 240 nm in 30 second intervals. The reaction mixture was prepared according to Table 7.2. In the case of control, instead of the enzyme extract, ten microliter of phosphate buffer was used.

Table 7. 2. Quantities and concentrations of consumed materials for measuring the activity of the CAT enzyme.

Component	Concentration	Volume (µl)
Phosphate buffer	50 mM	300
H ₂ O ₂	0.05%	30
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	360

7.2.4.2. ACTIVITY OF THE ENZYME GUAIACOL PEROXIDASE

The activity of the GPX enzyme was measured according to the protocol of Plewa et al. (1991). The reaction mixture was prepared according to Table 7.3. By adding the enzyme extract, the reaction was initiated and the absorbance was measured at 470 nm every 30 seconds for three minutes. Enzyme activity was quantitatively measured by the amount of tetraguaiacol formed by molar adsorption coefficient (ϵ) $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ 6.26. It is worth noting that four mole of H₂O₂ are needed to produce a mole of tetraguaiacol. In the case of control, 30 µl of phosphate buffer was used instead of the enzyme extract.

Table 7. 3. Quantities and concentrations of consumed materials for measuring the activity of the GPX enzyme

Component	Concentration	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50 mM	240
H ₂ O ₂	30%	10
Guaiacol solution	10 mM	10
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	290

7.2.4.3. ASCORBATE PEROXIDASE ENZYME ACTIVITY

The activity of the APX enzyme was measured by ascorbic acid oxidation at 290 nm with a molar absorption coefficient of $2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for ascorbate (Ranieri et al., 2003). The reaction mixture was prepared according to Table 4.4 and the activity of the APX enzyme was measured and recorded every 30 seconds in three minutes. In the case of control, 30 μ l of phosphate buffer was used instead of the enzyme extract.

Table 7. 4. Amounts and concentrations of consumed materials for the evaluation of APX activity

Component	Concentration	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50 mM	190
H ₂ O ₂	1%	10
Ascorbic acid	0.5 mM	30
EDTA	0.1 mM	30
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	290

7.2.4.4 ENZYME ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE

The level of activity of superoxide dismutase enzyme (SOD) is measured by the ability of this enzyme to inhibit the photochemical regeneration of nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) (Beauchamp and Fridovich, 1971). In this experiment, during photochemical events, initially, the free oxygen radicals, $\bullet\text{O}_2^-$, are produced, and then NBT is used to detect this radical. In fact, NBT detects free radicals, $\bullet\text{O}_2^-$. In general, SOD activity measurements consist of two main components: one that is a producer of superoxide radicals, and the second component detects produced superoxide radicals. In this thesis, the photochemical method was used to produce superoxide radicals using riboflavin, and the generated radicals were identified by photometry. An SOD activity unit is defined as a part of the enzyme, which inhibits the recovery of NBT by up to 50%. The reaction mixture was prepared according to Table 7.5 and kept under fluorescent for 20 minutes. For this experiment, two controls were considered: the darkness and the light of control. All dark micro tubes were covered with aluminium foil and kept away from light exposure. In the case of control, instead of the enzyme extract, 10 μl of phosphate buffer was used. NBT reduction was measured at 560 nm.

Table 7. 5. Concentrations and amounts of substances used to measure the activity of the SOD enzyme

Component	Concentration	Volume (μl)
Phosphate buffer	50 mM	2350
EDTA	13 mM	200
Methionine	50 mM	300
NBT	1 mM	2000
Riboflavin	0.2 mM	50
Enzyme extract		10
Total volume		4910

The inhibitory activity of the SOD enzyme was calculated by the formula $p = [(V-V_0) / V_0] \times 100$). In this formula, p; the percentage of inhibition or activity of the enzyme SOD, V; the reaction rate in the presence of the enzyme; and V_0 ; the rate of reaction in the absence of the enzyme.

7.2.4.5. ACTIVITY OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME

To measure PPO activity, the reaction mixture was prepared according to Kar and Mishra (1976), in accordance with Table 7.6. The absorbance of the reaction product, Purpurogallin, from the PPO reaction in tomato plant tissue with Pyrocatechol as a substrate, was measured at 420 nm wavelength. Absorption rate was measured and recorded in three minutes, every 30 seconds. In the case of control, 50 μ l of phosphate buffer was used instead of the enzyme extract.

Table 7. 6. Amounts and concentrations of consumed substances to measure the activity of the PPO enzyme

Component	Concentration (mM)	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50	200
Pyrocatechol	50	50
Enzyme extract	-	50
Total volume	-	300

7.2.4.6. ACTIVITY OF THE PHENYL ALANINE AMMONIA-LYASE

To measure the activity of the PAL enzyme in tomato plants, 0.5 g of powdered leaves per millilitre of 50 mM Tris-HCl buffer with a pH of 7.8 was homogenized. The homogenous product was centrifuged at 13000 \times g for 15 minutes at 4 $^{\circ}$ C. The obtained supernatant was used as an enzyme extract. The activity of the PAL enzyme is determined by the rate of production of cyanic acid (Wang et al., 2006). The reaction mixture was

prepared for measurement of PAL activity according to Table 7.7 for treatment and control. However, in the case of control, instead of an enzyme extract of 30 μ l Tris-HCl buffer was used.

Table 7.7. Concentrations and volumes used to measure the activity of the enzyme PAL

Component	Concentration (mM)	Volume (μ l)
Tris-HCl buffer	50	100
L-phenylalanine	30	60
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	190

The prepared mixture for treatment and control was kept at 37 °C for one hour. Adding 50 μ l of 6 M HCl to each sample, the enzyme reaction was stopped. The reaction product was extracted by adding one millilitre of ethyl acetate to each sample, and then evaporated with nitrogen gas. To the residual reaction, 300 μ l of NaOH was added 0.05 M. Finally, the concentration of cinnamic acid was estimated by optical absorption measure at 290 nm.

7.2.4.7. TOTAL PHENOLIC CONTENT

The total phenolic content of tomato leaves was measured by colorimetry method through the interaction of phenolic compounds with a reagent, called Folin-Ciocalteu (F-C). The F-C method, based on the transfer of electrons in an alkaline environment, is a phenolic compound to phosphomolybdic/phosphotungstic acid compounds, which results in the formation of blue compounds that can be measured at 760 nm with a spectrophotometer. The Ainsworth and Gillespie (2007) protocol was used to measure total phenolic content. The standard curve is plotted using Gallic acid, equivalent to phenolic content. For preparing the standard curve, various concentrations of Gallic acid were used from 0.33 to 2.5 mg/ml. The Gallic acid solution was prepared in 95% methanol (v / v). The method

of doing this was that 50 milligrams of plant tissue were homogenized in one millilitre of 95% methanol. The homogenized material was kept for 48 hours in darkness and at room temperature. Then, the samples were centrifuged at $13000 \times g$ for 15 minutes at a temperature of $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. In addition, $100\ \mu\text{l}$ of each standard sample, 95% methanol, were added to the two-millilitre micro tubes, respectively for treatment, standard and control. Then, 200 microliters of 10% F-C reagent were added to the micro tubes and the tubes were well-vortexed. In the next step, $800\ \mu\text{l}$ Sodium carbonate ($700\ \text{mM Na}_2\text{CO}_3$) was added to the micro tubes. The samples were kept at room temperature for two hours. For optical density readings, $200\ \mu\text{l}$ of each sample was recorded in 96-well plates. Finally, the absorbance was measured at an appropriate wavelengths of 765 nm.

7.2.4.8. PROLINE CONTENT

Proline content of the treated and untreated tomato plants was measured by Carillo and Gibon (2011). Proline is a highly soluble amino acid, which is easily extracted from the plant tissue. For proline content measurement, 0.5 g of plant tissue was kept in a mixture of volume ratio: 60 : 40, water : ethanol. The homogeneous product was prepared and kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one night. Then, the samples were centrifuged at $14000 \times g$ for 5 minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. To prepare the standard curve, proline solutions were prepared at a concentration of 0.0156 to 1 mM, in the same medium as 60:40, water: ethanol. To prepare the reaction mixture, a 1% (w / v) Ninhydrin reagent was added to acetic acid (60% v / v) and ethanol (20% v / v). Then, $300\ \mu\text{l}$ of the reaction mixture was added to each of the prepared micro tubes for testing. Subsequently, $150\ \mu\text{l}$ of standard, ethanol mixture: water or enzyme extracts were added to the standard microtiter, control and treatment, respectively. Micro tubes were kept at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes and then centrifuged at 2500 rpm for one minute at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A $100\ \mu\text{l}$ sample was taken from the supernatant and read and recorded by optical spectrometry at 520 nm.

7.2.4.9. PROTEIN CONTENT

The protein content of the samples was determined by the Bradford method (1976). For this purpose, 0.5 g of plant tissue was homogenized in a millilitre of 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.8. Samples were centrifuged at 13000 $\times g$ for 15 minutes at a temperature of 4 ° C. The protein found in the supernatant was measured. In order to obtain a standard curve, Bovine Serum Albumin (BSA) protein was used as standard protein. Concentrations of 2 to 0.00625 milligrams per millilitre of BSA were prepared. From Bradford Reagent, 500 μ l was taken and mixed with 10 μ l of plant extract. The optical density was measured at 595 nm and 450 nm at two wavelengths.

7.2.4.10. SOLUBLE CARBOHYDRATES

To measure the soluble carbohydrate, 0.5 g of plant tissue was homogenized in a millilitre of deionised water. The obtained homogenous product was centrifuged at 14000 rpm for 10 minutes at 4 ° C. Determination of carbohydrate concentration in the supernatant was carried out using an Anthrone reagent, and based on the Dreywood method (1946). To obtain the standard curve, various concentrations of glucose were used, from one to 0.0039 μ g / ml. The reagent of Anthrone was prepared in sulfuric acid, so that two grams of Anthrone were mixed with one liter of 96-98% sulfuric acid. The reagent was transferred to a glass container covered with aluminium foil. Then, each of the micro tubes prepared for testing, 600 μ L of the Anthrone agent was added. After that, 200 μ l of standard, water or herbal extracts were added to the standard, control and treatment microtiter, respectively. Micro tubes were kept for 10 minutes at 4 ° C (in the refrigerator), then, for 20 minutes at 100 ° C, and then at ambient temperature for 20 minutes. Finally, the absorbance of light in 200 μ l of the resulting mixture was read at 620 nm.

7.3. RESULTS AND DISCUSSION

In this section, the metabolically and biochemically effect of Iranian Bt strain on tomato plant cells were studied. The effect of Bt suspension in two different ways were assessed in the form of spraying on the foliage and plant leaf or / and inoculation of the rhizosphere.

In general, based on the results, inoculation of tomato plant with Bt strain increased the activity of examined antioxidant enzymes. Among the studied parameters, the results related to the catalase, ascorbate peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase enzymes and the phenolic, protein, proline and soluble carbohydrate content, are given in detail and discussed completely.

7.3.1. CATALASE ACTIVITY

The activity of catalase enzyme in both soil and spraying of Bt on phylloplane treatments increased significantly compared to controls ($P < 0.0001$). As a result of plant interactions with spore and crystal Bt, the highest activity of catalase enzyme was observed in soil treatment on 2, 7, and 10 days after inoculation. In the soil treatment, after one day, the activity of the catalase enzyme increased sharply so that on the second day it reached the maximum of its activity, but then, until the fifth day, proceeded with a downward trend. From the fifth day until the tenth day, the level of activity of the catalase enzyme has increased dramatically and regained its maximum activity on the seventh and tenth day. In phylloplane treatment, only one peak associated with the highest activity of the catalase enzyme was recorded on the tenth day (Figure 7.2). After the tenth day, the activity of the catalase enzyme has been decreasing. The highest activity of catalase enzyme in soil treatment was 0.039 and in phylloplane treatment, it was 0.059 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

The catalase enzyme is one of the most important antioxidant enzymes that acts in the main resistance system against the accumulation and toxicity of oxygen radicals by eliminating H_2O_2 (Shakir et al., 2018). In this research, the activity of catalase enzyme has increased in both treatments inoculated with Bt spores and crystals. In comparing the effect of Bt with chemical pesticides on the biochemical reactions of the plant, it is possible to increase the activity of the catalase enzyme in tomato plants following treatment by Imidacloprid pesticide (Shakir et al. 2018).

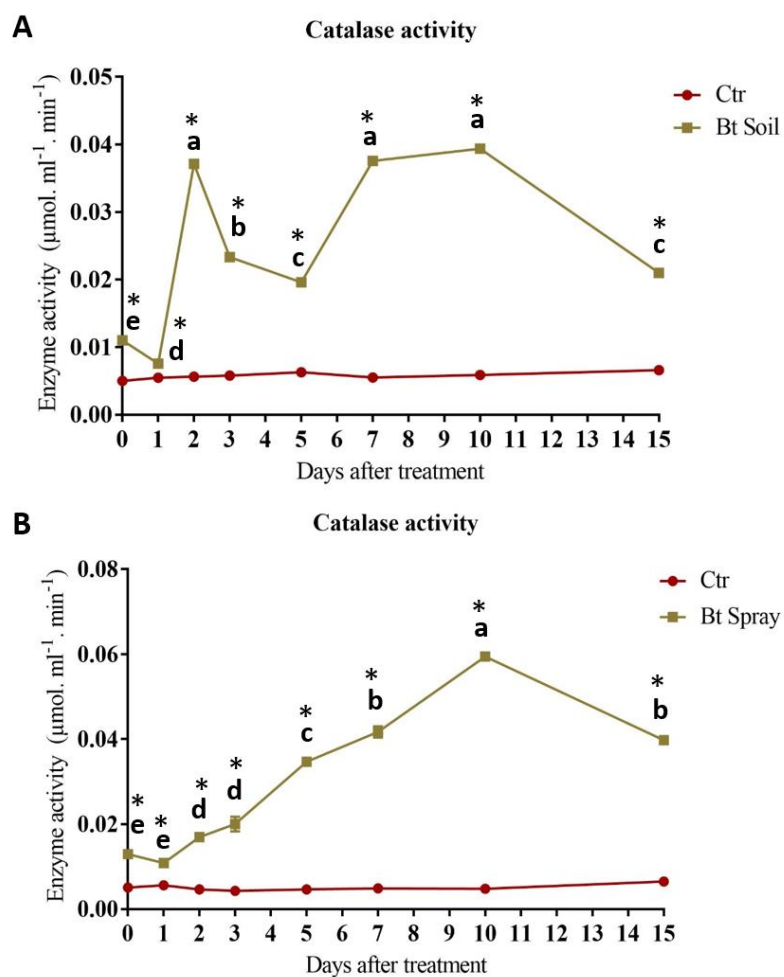


Fig. 7. 2. The average of catalase activity (\pm standard error) in $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$, in tomato plants treated with and without Bt. Panel A shows the soil treatment and panel B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each point of time indicate a significant difference ($p < 0.05$) in the level of activity of the catalase enzyme in the treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$).

7.3.2. ACTIVITY OF ASCORBATE PEROXIDASE ENZYME

The level of activity of ascorbate peroxidase enzyme in tomato plants that are inoculated with Bt through phylloplane, has increased compare to related control.

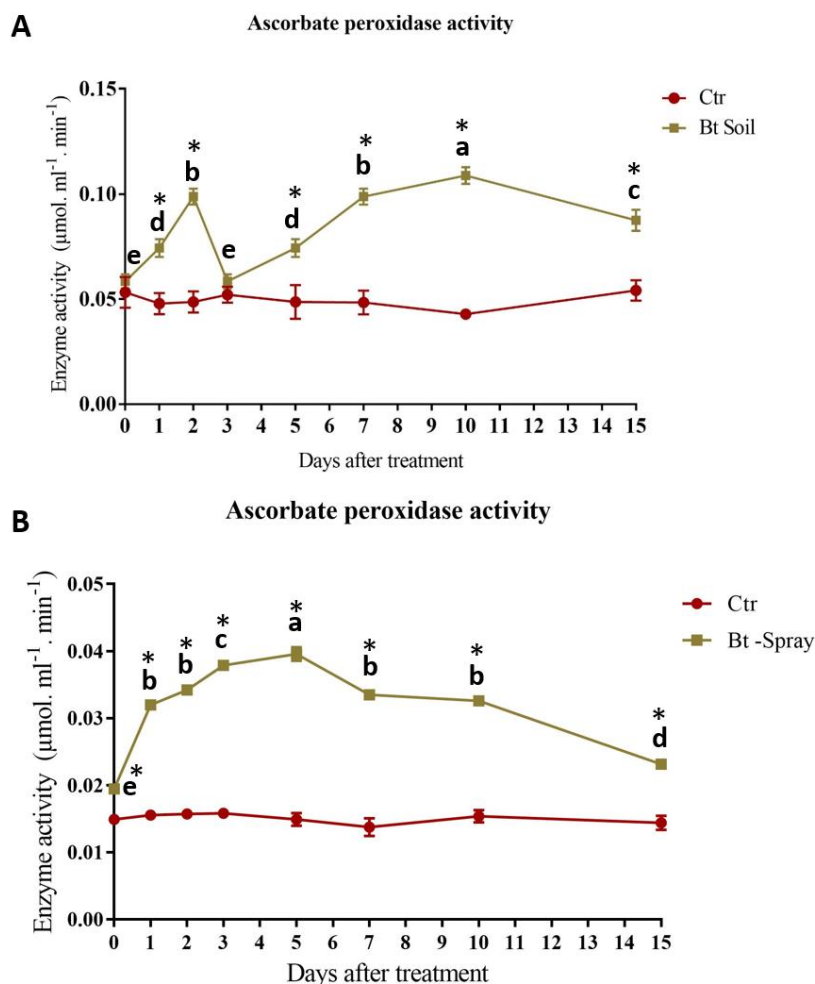


Fig. 7. 3. The average of ascorbate peroxidase activity (\pm standard error) in terms of $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ in tomato plants treated and untreated with Bt suspension. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each point of time indicate a significant difference ($p < 0.05$) in the level of activity of the ascorbate peroxidase enzyme in the treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$).

The activity of APX enzyme significantly increased in the two treatments of soil and spray on the phylloplane, in comparison to both controls. In soil treatments, the activity

of the APX enzyme is increasing from the first hours after inoculation, and on the second day it reached to the peak, then a descending process was observed. However, again on the tenth day, the second peak of its activity was detected (Figure 7.3). Generally, APX activity during different days in soil inoculation treatment was higher than Bt spray treatment on phylloplane ($P < 0.0001$).

According to the obtained results in this study, as a result of the interaction of Bt with the tomato plant, the level of activity of the ascorbate peroxidase enzyme has also increased. Ascorbate peroxidase enzyme is one of the most important antioxidant enzymes produced in plants for the detoxification of H_2O_2 . This enzyme uses ascorbate, as an electron donor, to reduce H_2O_2 (Dong-Jun et al., 2012).

7.3.3. PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE ENZYME ACTIVITY

The activity of phenylalanine ammonia-lyase has been altered in tomato plants following treatment with Bt suspension (mixture of spores and crystals). Based on the results, the activity of the PAL enzyme increased significantly compared to the control in some of the selected time intervals. In both treatments (rhizosphere and phylloplane), the activity of the PAL enzyme reached to its peak on the first, seventh and fifteenth days after inoculation (Figure 4.7). Then, after the seventh day, the procedure decreased, but again, after the tenth day, the enzyme activity had a rising trend till the end of our selected time intervals.

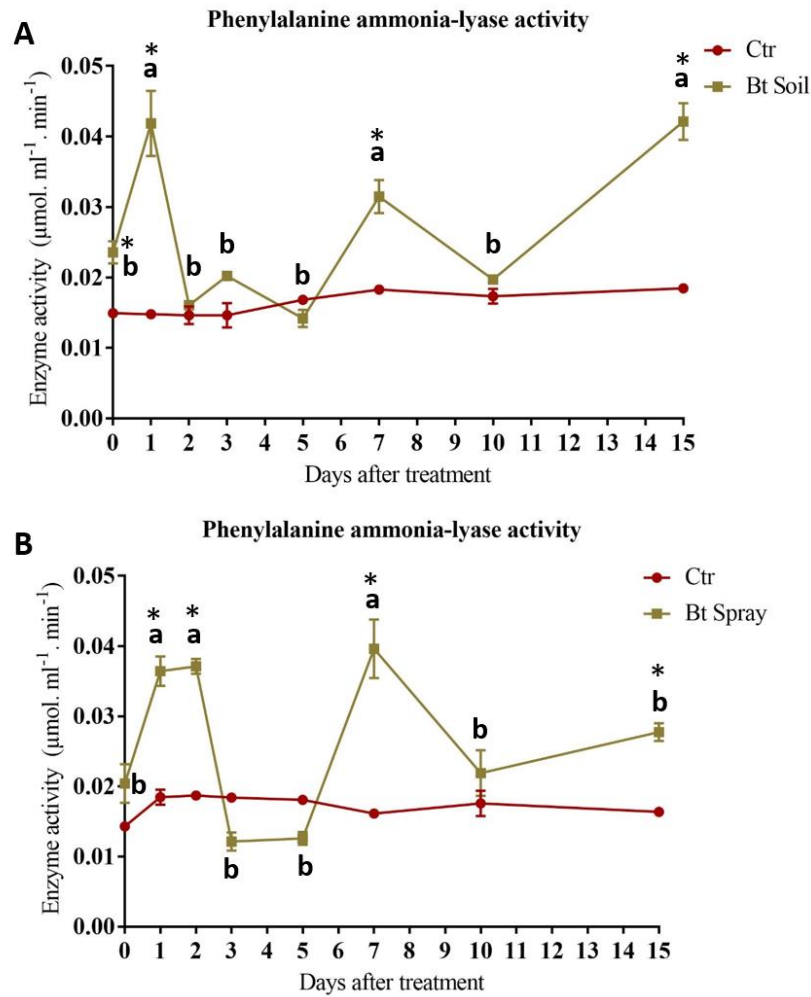


Fig. 7. 4. The average of phenylalanine ammonia-lysis activity (\pm standard error) in terms of $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$, in tomato plants treated and untreated with Bt. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane.

The phenylalanine ammonia-lyase enzyme is a key enzyme in the pathway of phenylpropanoid biosynthesis. Moreover, this enzyme (PAL) plays a major role in the production of flavonoids and lignin synthesis. Phenylalanine ammonia-lysis enzyme activity is reported to be directly related to the immune system of many plants against pathogens invasion (Thilagavathi et al., 2007).

7.3.4. POLYPHENOL OXIDASE ENZYME ACTIVITY

The activity of polyphenol oxidase enzyme in tomato plants treated with Bt spores and crystals decreased significantly comparing to control plants.

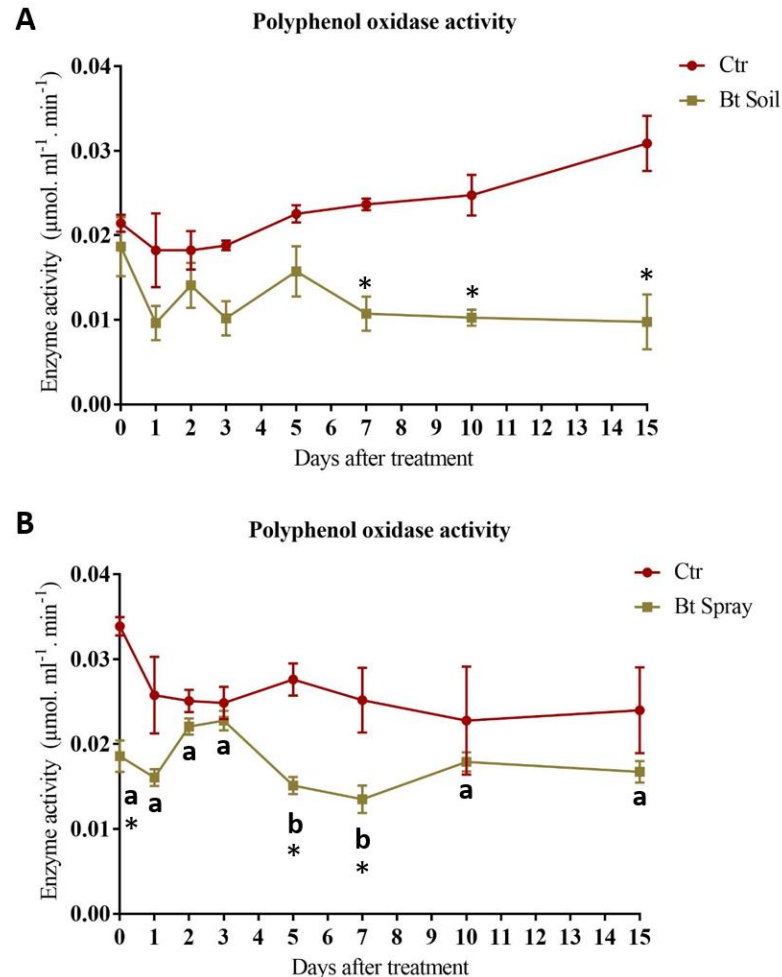


Fig. 7. 5. The average of polyphenol oxidase enzyme activity (\pm standard error) in $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ in tomato plants treated and untreated with Bt. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane.

PPO activity decreased in both soil treatments and Bt spray on the phylloplane, as compared to the control (Fig. 7.5). The lowest levels of activity of this enzyme were observed in the treatment of phylloplane on days 5 and 7. However, there was no significant difference in PPO activity in soil treatments during different days ($P = 0.1409$).

The polyphenol oxidase enzyme plays a role in inducing resistance in plants against pests and pathogens. The induction of polyphenol oxidase activity by pathogens has been reported in many plants (Schaller, 2008). In tomato plants, increasing the expression and the activity of the polyphenol oxidase enzyme has led to an increase in plant resistance to *Pseudomonas syringae*.

7.3.5. PHENOLIC CONTENT

The amount of phenolic compounds in soil treatment increased significantly from the third day until it reached to the peak on the 10th day after inoculation and then followed a downward trend. However, in the case of Bt spray treatment on phylloplane, phenolic compounds increased significantly from the first hours of inoculation compared with the control and reached to the first peak one day after spraying. The second peak was observed on the seventh day, and then, as in the soil treatment, the amount of phenolic compounds decreased (Fig. 7.6). The highest phenolic content in soil treatments and spray on phylloplane was 1.786 and 1.767 mM, respectively, which did not differ significantly (P-value = 0.7541).

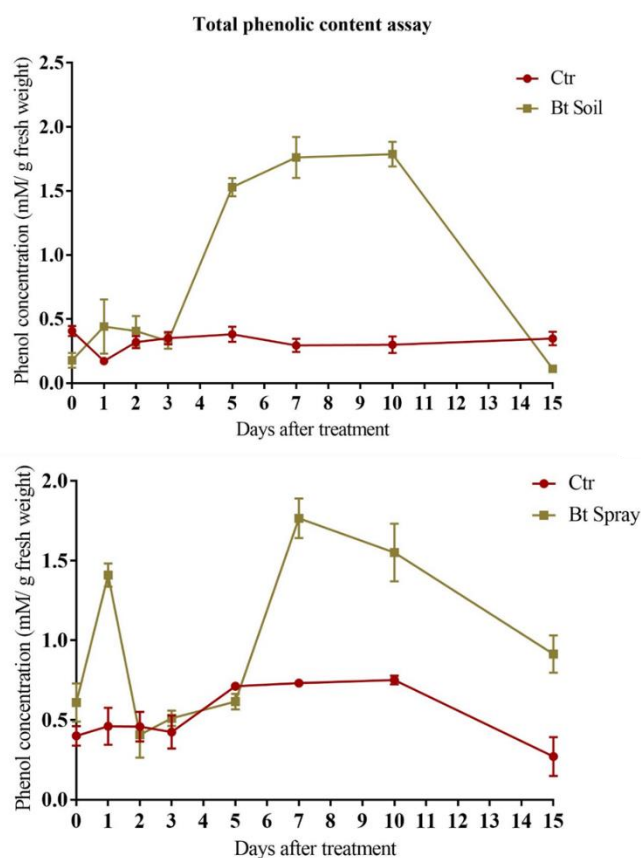


Fig. 7. 6. The average of total phenolic content (\pm standard error) in mM/g fresh weight. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each point of time indicate a significant difference ($p < 0.05$) in phenol concentration in each treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$).

The direct and positive correlation has been reported between increasing the activity of peroxidase enzymes under adverse conditions and the strengthening of cell walls of the plant with phenolic compounds (Mandal et al., 2011).

7.3.6. SOLUBLE CARBOHYDRATE CONCENTRATION

Under the influence of inoculation of tomato plants with Bt, in soil treatment, the concentration of soluble carbohydrates increased compared to the control (Figure 7.7).

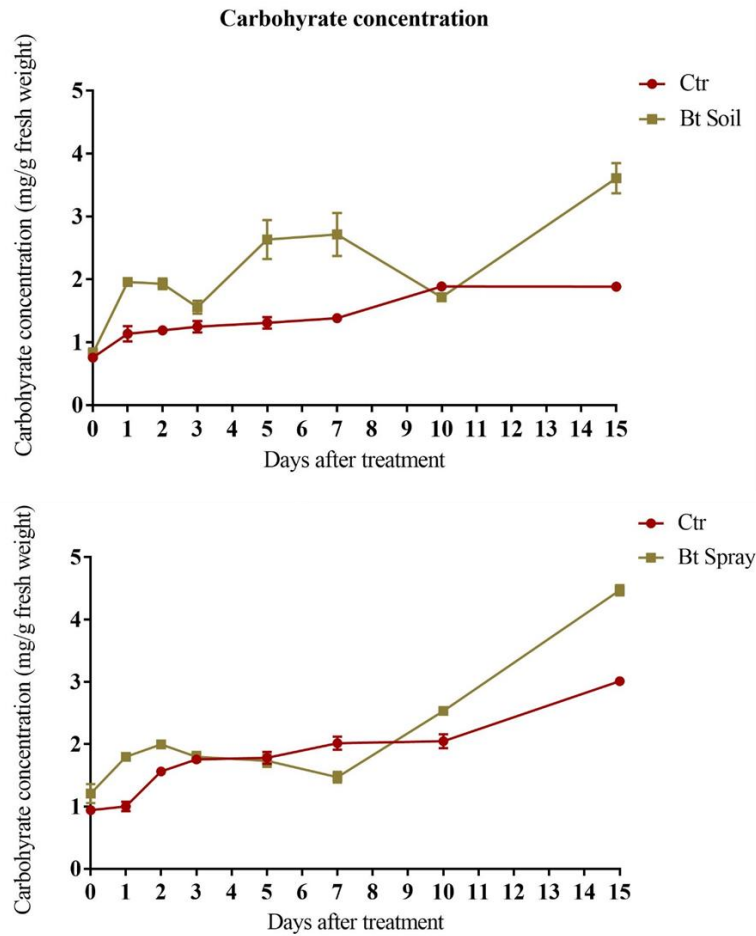


Fig. 7. 7. The average of concentration of soluble carbohydrates (\pm standard error) in mg/g fresh weight, in tomato plants treated and untreated with Bt suspension. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each time point indicate a significant difference ($p < 0.05$) in carbohydrate concentration in each treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$).

One and five days after inoculation of the plant with Bt, the concentration of soluble carbohydrate reached to the first and second peaks, respectively. Finally, until the last day of the experiment (on the fifteenth day), the carbohydrate concentration in the tomato plant tissues has an upward trend. However, in the case of Bt spray treatment on phylloplane, the second day after inoculation, the concentration of soluble carbohydrates

reached to maximum, and then proceed to a downward trend. However, after the seventh day, until the last day of the experiment, the trend is rebounding (Figure 7.7).

7.3.7. TOTAL PROTEIN CONTENT

The protein content of tomato plant in phylloplane is influenced by the interaction of plant cells with Bt spores and crystals. Therefore, the total protein concentration in the soil treatments on the seventh and fifteenth days after inoculation was increased ($P = 0.0002$) and decreased ($P = 0.0043$), respectively. In the case of Bt spray treatment on phylloplane, on the 2nd and 10th days after inoculation, an increase in protein concentration was observed in treated plant tomatoes ($P < 0.0001$). But finally, in the case of Bt spray treatment on phylloplane, similar to the soil treatment, total protein concentration, after the second peak, showed the decreasing trend until the last day of the experiment (Figure 7.8). However, for the rest of the experimental days, the total protein content in treatments did not have a significant difference comparing to the control.

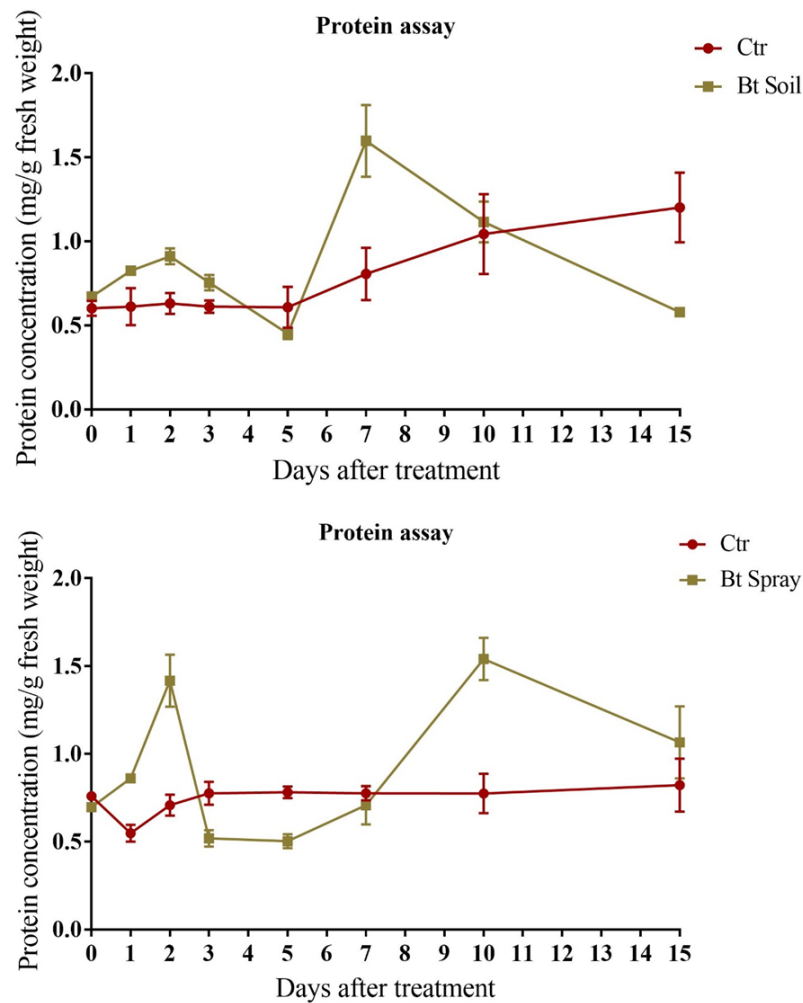


Fig. 7. 8. The average of total protein concentration (\pm standard error) in mg/g fresh weight in tomato plants treated and untreated with Bt. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each point of time indicate a significant difference ($P < 0.05$) in protein concentration in each treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$).

Protein content in tomatoes treated with Bt did not differ significantly from the control. In soil treatment, on the seventh day and in the case of Bt spray treatment on phylloplane, the increase in protein concentration was observed on the second and the tenth day after inoculation. Previous studies on the effect of chemical pesticides on the plant have shown

that the use of pesticides such as Imidacloprid, Cypermethrin and Chlorpyrifos has reduced the protein content of the plant tested (Parween et al., 2012; Shakir et al., 2018).

7.3.8. PROLINE CONCENTRATION

Proline concentrations in Bt-treated tomato plants was studied as one of the most important metabolites that accumulate in tissues in response to oxidative stresses, contribute to the damage to plant tissue as a result of biotic stress. The phenolic content of Bt-treated plants using soil inoculum was lower in the early days of the experiment than in the control, but on the 5th and 15th days, the proline concentration was increased, which increased compared to the treatment. The similar situation was observed in Bt spray treatment on phylloplane, which was not observed in the early days of plant inoculation. There was no significant difference between proline concentration in control and treatment (Fig. 7.9). But from the seventh day after inoculation, proline accumulated in plant cells and had a significant difference with the control (on days 7, 10 and 15 after inoculation). As a result, due to the interaction of tomato plants with Bt, proline accumulation in both treatments was more than control in the final days of the experiment.

Proline is one of the most important compounds that can be produced in many plant species in response to stress such as salinity, drought, cold, food poverty, heavy elements, pathogenic invasions, and high acidity. Proline is a small molecule that can easily dissolve in water at physiological pH, as a result of the accumulation of proline in plant cells under stress conditions, proline can reduce the possible cell damage. Generally, proline helps to maintain and protect the plant cells through the capture of free oxygen radicals. Plant cells have the ability to store proline or quickly decompose if needed. In osmotic stress conditions, plant cells rapidly increase the proline content in plant tissues and store proline in cells (Trovato et al., 2008).

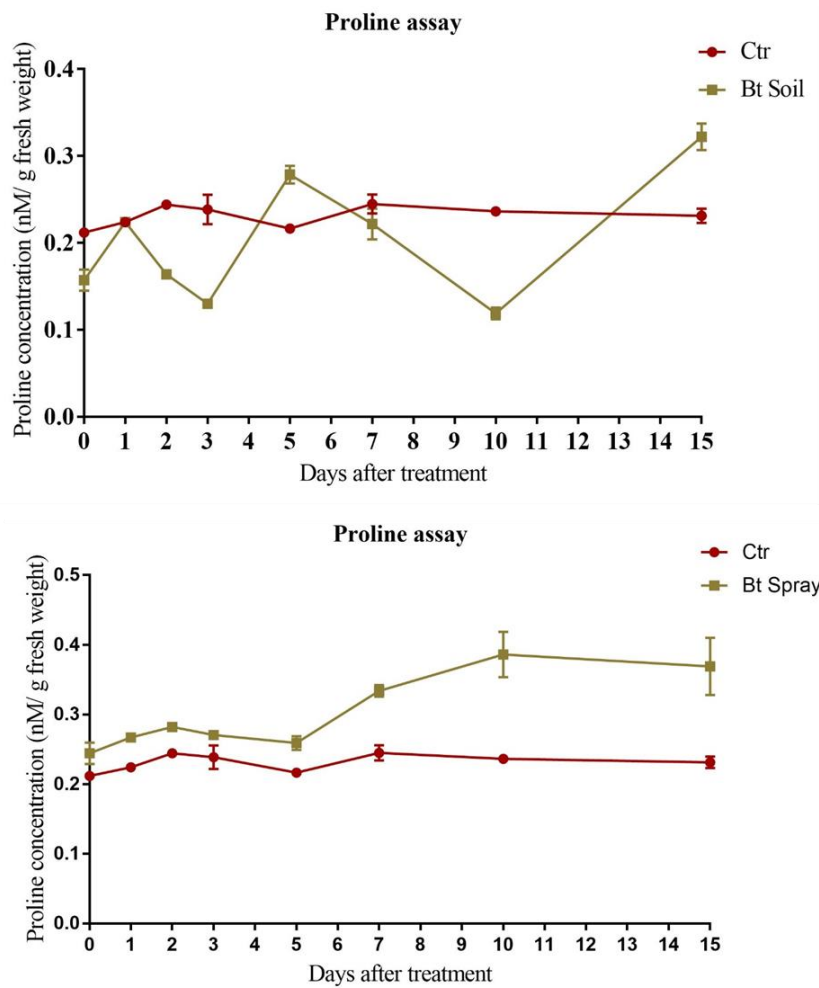


Fig. 7. 9. The average of total proline concentration (\pm standard error) in nM/g fresh weight, in tomato plants treated and untreated with Bt suspension. Figure A shows the soil treatment and figure B; the spray treatment on the phylloplane. The letters at each point of time indicate a significant difference ($P < 0.05$) in proline concentrations in each treatment during different days and a significant difference between treatment and control ($P < 0.05$)

Incensement and accumulation of proline contents in plant cells is due to induction of *p5cs* (Pyrroline-5-carboxylate synthetis) gene expression and *proDH* (Proline dehydrogenase) gene suppression. When the stress is eliminated in the plant, proline

concentration decreases due to the excess toxicity of the proline in the plant cell. Previous studies have shown that the concentration and accumulation of proline in plant cells that are under the influence of pathogens, is greatly increased (Fabro et al., 2004; Trovato et al., 2008). As a result, determining the concentration of proline amino acids is of particular importance for evaluating the physiological state and stress tolerance in plants.

Plant cells are capable of producing and detoxifying the oxygen-free radicals. Under normal conditions, free radicals of oxygen are inevitably produced as reaction products in plants. Plant cells have mechanisms that minimize the concentration of free oxygen radicals. Plants in the face of potential pathogens produce oxidative bursts, leading to the formation of radicals such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl. These oxidative bursts stimulate the plant's defence system in two phases; the first phase has a short period of time, and it is specialized, and begins within a few minutes after the pathogen is detected by the plant. While the second phase is longer, it begins after a long time after the pathogen is detected by the plant. The second phase of oxidative bursts induces the expression of genes involved in the immune system leading to resistance to disease or pathogen invasion (Apel and Hirt 2004).

The occurrence of oxidative bursts and the production of free oxygen radicals occurs immediately after the pathogen invasion to the plants. In studies of plant cells infected with the pathogens, the pathogen interaction began one to two minutes after contamination, reaching the maximum after several minutes and expiring within 30 to 60 minutes. But when plant tissue are infected to the pathogens, the plant response begins after a longer period of time, 8 to 12 hours after inoculation (Wojtaszek 1997). In this study, in the case of CAT and PAL enzymes, an increase in antioxidant activity was observed two hours after inoculation with spore and crystal Bt strain (zero day in the selected time intervals).

The results of physiological and biochemical responses of tomato plants to Bt strain in this thesis are compared with the results of studies that have shown the effect of bacterial or non-pathogenic bacteria (useful bacteria or antagonistic agents) on different plants. Similar to our results, previous studies showed that in the leaves of the tomato plant infected with the gram-negative bacterium *Ralstonia solanacearum*, hydrogen peroxide

has been identified. As the population of the bacterial increased, the free radicals produced in the plant are also increased (Flores-Cruz and Allen 2009).

The results of this study were similar to those of Mandal et al. (2011). Thus, roots of two different varieties of tomato, AM as a sensitive cultivar and BT-10 as a resistant to bacterial rots, were inoculated with 2.5 ml of suspension of *R. solanacearum* with a concentration of 7×10^6 CFU.ml⁻¹. Tomato inoculation with *R. solanacearum* caused incensement in H₂O₂ production in both tomato varieties. After the first oxidative burst, a sharp decline in H₂O₂ production was observed in both cultivars. This decreasing trend continued on the sensitive cultivar (AM), while in the resistant cultivar (BT-10), again showed a sharp increase in the production of H₂O₂. After the second peak of H₂O₂ production in the BT-10, the accumulation of H₂O₂ decreased gradually. The activity of two SOD and CAT enzymes increased 12 hours after inoculation with the pathogen. The highest activity of SOD in the sensitive tomato variety was reported 72 hours after inoculation. However, in the case of resistant cultivars, the increasing trend of SOD activity was observed until the end of the test period. In the case of CAT, the enzyme activity in the resistant cultivar was significantly more sensitive than the cultivar and has been increasing until the end of the experiment. The activity of the GPX enzyme has been markedly increased in both cultivars after a short period of time from inoculation. The GPX activity reached to its peak in the resistant cultivar at 24 and 96 hours after inoculation. The activity of the APX enzyme has also increased sharply in the resistant cultivar, in comparison to the susceptible cultivar and controls. It should be noted that the highest phenolic content was found in the resistant cultivar with the pathogen, which peaked 72 hours after inoculation.

The results of this study on the activity of antioxidant enzymes showed two incremental phases, which has been observed in many pathogenic interactions (Bargabus et al., 2003; Mandal et al., 2011). There are several reasons for observing two incremental phases in the production of free oxygen radicals in plant pathogenic interactions. It has been shown that H₂O₂ is essential for the physical strengthening of the cell wall of the plant through the association between cell wall proteins and peroxidases that catalyse the ligninization process (Lamb and Dixon, 1997). On the other hand, the high concentrations of free

oxygen radicals are directly toxic to microorganisms. Consequently, higher concentrations of H₂O₂ in resistant cultivars, as mentioned in many studies (Tomankova et al., 2006; Chen et al., 2008), are justifiable. The results of this study indicate that the activity of ASC, CAT and PAL enzymes is two maximal limits. In addition to the above, it has been reported that the Bt has the ability to migrate from the root to the plant leaf (Damgaard 2000; Bizzarri and Bishop 2007; Maduell et al., 2007; Gomes Monnerat et al., 2009). Consequently, two phases of enzyme activity were observed due to the migration of Bt from soil to plant leaf and the like due to the ability of the bacterium to disperse into the plant and to colonize the plant. The first phase, which was observed immediately after inoculation, was due to the initial inoculation and the second phase, probably due to the bacterial endophytic in the tomato plant.

The interaction of *B. subtilis* with host plant has been investigated in several studies. *B. subtilis* bacterium is one of the most effective antagonists in biological control of plant pathogens. This bacterium, on one hand through the production of enzymes such as chitinase and beta-1 and 3-glucanase and antibiotics, can control the plant diseases caused by different pathogens agents, and on the other hand, by increasing the activity of the enzymes involved in the immune system, induces systemic resistance in the plant. Different strains of *B. subtilis* increases the activity of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes (Jayaraj et al., 2004; Chen et al., 2010). Similar to the results of AzLp strain interactions with tomato plants, AR12 strains of *B. subtilis* caused increased activity of CAT, PAL, PPO and SOD enzymes in tomato plants inoculated with bacteria. This is important in preventing the prevalence of bacterial wilt and induction of plant resistance (Li et al., 2008). However, the results of the study performed by Jayaraj et al. (2004) regarding the reduction of the activity of CAT and PAL enzymes are incompatible with this thesis. Results of spraying of *B. subtilis* AUBS1 strain on rice plant significantly decrease the disease of rice pods by increasing the activity level of PAL and CAT enzymes (Jayaraj et al., 2004).

The effect of *B. subtilis* bacteria on the activity of the cucumber plant immune system for the control of *Fusarium* wilt disease, has been reported by Chen et al. (2010). The highest levels of peroxidase activity in cucumber were when the plant was inoculated with *B.*

subtilis bacteria. The results obtained from this study on the activity of catalase enzyme in tomato plants are similar to the results of Chen et al. (2010). As a result, treating the cucumber seeds and root soil (rhizosphere) with *B. subtilis*, effectively control rot disease caused by *Fusarium* spp. The highest activity of peroxidase enzyme was observed in the plants treated with *B. subtilis*. In the treatment of cucumber seed inoculated with bacterial suspension, from the first day of the experiment until the fifth day, the activity of the peroxidase enzyme has risen. Then, on the fifth day, there was a marked decrease in enzyme activity, but again until eleven days, the activity of the enzyme was ascending. The activity of the PAL enzyme in cucumber plants treated with *B. subtilis* was similar to our research results, (Chen et al., 2010). In addition, the activity of PAL in the treatment was greater than the control, and in the treated plants, a different trend in the activity of the PAL enzyme was observed during the 15 days of experiment. The maximum activity of the PAL enzyme was recorded in the treatment on the fifth and eleventh days after inoculation. These results are contradictory with the research by Chen et al. (2010) regarding to PPO activity in cucumber plants treated with *B. subtilis*. In the research, PPO enzyme activity was higher in treated plants compared to control, despite having a variable rate.

The strain of GS1 from Bt induces resistance in cucumber plants to the *Rhizoctonia solani* fungus. Similar to the results of this study, the activity of the gaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in cucumber treated with Bt increased compared to the control. However, the highest levels of activity of ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes are in cucumber plants treated with *R. solani* fungi. Due to the increased activity of the enzymes involved in the immune system by the Bt, the plant disease of the cucumber plant has been suppressed (Dong-Jun et al., 2012). Inoculation of corn with different species of *Bacillus* genus namely, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*, in non-stress conditions, caused changes in the activity of the antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase, catalase and Glutathione peroxidase. However, under drought stress, a significant increase in the activity of these enzymes was observed in inoculated corn plants compared to non-inoculated plants with *Bacillus* spp. (Vardhalajula et al ., 2011). The results indicated

that the corn plant was inoculated with *Bacillus* spp. responded physiologically and this response can reduce the negative effects of drought stress.

According to the study of Egamberdieva et al. (2017), the use of *B. subtilis* NUU4 endophyte strain improved the growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum*) plant, increased resistance to salinity stress and reduced the severity of root rot disease caused by *F. solani*. The inoculation of Chickpea with *B. subtilis* caused a decrease in H₂O₂ production and increased proline content of the plant. In the present study, the proline content of chickpea plant treated with Bt increased compared to that of the control plants.

Based on the results obtained in this chapter from our study, it seems that the tomato plant initially considered our tested Bt strain as a pathogen following exposure to high concentrations of Bt. Therefore, the immune system of tomato plants responded to Bt strain and consequently increased the activity of the plant's antioxidant enzymes. Increasing the activity of the enzymes associated with the plant's immune system plays an important role in inducing plant resistance and suppressing plant pathogens population, resulting in a significant and important aspect of the interaction between bacteria Bt and host plants. The activity of the anti-oxidant enzymes is then restored to the natural state because tomato plants did not recognize Bt as a pathogen. As a result, if a plant is attacked by a pythopathogen that has been sprayed or inoculated with Bt, the plant is less susceptible and more capable of combating the disease.

CHAPTER EIGHT

GENERAL CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS

8.1. OVERALL CONCLUSION

In this dissertation, the initial studies including observation of spores and crystals, morphological characteristics of crystals and bacterial colonies, and catalase test were carried out on 130 Iranian Bt strains. Based on sodium acetate selective method, Bt strains were isolated from diverse environmental sources and infected, dead and diseased larvae and initially detected. Then, 130 Bt strains were screened based on their insecticidal activity on second instar larvae of *P. interpunctella* at a concentration of 10^8 spores/ml. In the sense that the selected strains were classified into three groups of high, moderate and low toxicity, based on the severity of the disease on *P. interpunctella* larvae. Out of the 130 strains, only seven Bt strains were found in the high toxic for *P. interpunctella* second instar larvae and categorized in high virulence group. Whereas, most of the studied Bt strains (119 strains out of 130) were not toxic to *P. interpunctella* larvae and categorized in low virulence group.

For further study, a total of seven Bt strains were selected, and several features were investigated in them. Five Bt strains of IE-1, AzLp, IE-2, IP-2 and IEp, isolated from infected larvae produced pyramidal crystals and showed high toxicity towards *P. interpunctella* larvae. Two Bt strains of KhF (with spherical crystals) and RM (with irregular crystals), respectively, belonged to moderate and low toxicity groups, were also selected for further investigations. As a result, in the first part of this thesis, the characterization of seven Iranian Bt strains was performed comprehensively based on; gene content, the composition of crystal proteins, protein profile, the spectrum of insecticidal and cytotoxic activity against lepidopteran insect pests and determination of β -exotoxin production.

- Introduction of AzLp, IE-2, and IP-2 strains as suitable candidates for development of future Bt based bio-insecticides.

In conclusion, based on the results from the first section, the gene content (*cry1*, *cry2*, *cyt1*, *cyt2*, *ps1*, *ps2*, *ps3*, *ps4*, *vip1-2*, *vip3* and *sip* genes) of the selected Bt strains were determined by PCR-based methods and the insecticidal proteins in each Bt strain were

predicted. Afterwards, by using the LC-MS/MS method, the composition of the proteins in the crystalline inclusions of Bt strains was determined and their insecticidal activity was predicted. However, bioassay experiments (with insects or with cell lines), as an essential and inevitable step in the characterization of Bt strains, provide comprehensive information on insecticidal and cytotoxic activity of Bt strains. These findings led to the introduction of AzRp, IE-2 and IP-3 Bt strains as suitable candidates for the production of Bt-based bio-insecticides. Because these three strains have the potential to control economically important lepidopteran pests, they have insecticidal crystalline proteins toxic for lepidopteran pests such as; Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Da proteins, as well as none of the selected Bt strains produced β -exotoxin.

- Introducing the new gene of *cryIIa38*

The second part of this thesis has focussed on cloning of the new Bt gene namely *cryIIa38*. The *cryIIa38* gene, was identified from the screening study of *B. thuringiensis* IE-1 strain and successfully cloned. The complete sequence of this gene encodes a protein of 720 amino acids with a length of 2160 nucleotides. The newly identified toxin was named CryIIa38, according to the decision of Bt δ -endotoxins nomenclature committee, (<http://www.btnomenclature.info>). After expression, extraction and purification of CryIIa38 protein, insecticidal and cytotoxic activity were studied. The unique features of the CryII family of toxins, most importantly having different mode of action comparing to other Cry proteins, were the criteria for choosing this gene. The structural characterization, insecticidal and cytotoxic activity of CryIIa38 protein was compared with the CryIIa38 -I116V (CryIIa38 mutant) and CryIIa7 proteins. The results show that the *cryIIa38* gene is a suitable candidate for corn transgenic resistant to European corn borer, *Ostrinia nubilalis*.

Based on the results, the protoxins of all three studied proteins, CryIIa38, CryIIa38 - I116V and CryIIa7, had the same molecular weight, about 80 kDa. Also, trypsin activation resulted in a stable core with a molecular weight of 50 kDa. The results of bioassay of the three studied proteins showed that protoxin of all three proteins were highly toxic for *G. molesta* larvae. Similarly, *O. nubilalis* larvae showed a high

susceptibility to the Cry1Ia38 protein. However, the four insect species of *S. exigua*, *S. littoralis*, *H. armigera* and *M. brassicae* were not highly susceptible to Cry1Ia proteins.

- Difference in insecticidal activity of Cry1Ia38 protein following the occurrence of single point mutation.

It should be noted that the two toxins Cry1Ia38 and Cry1Ia38 -I116V exhibited different insecticidal activity despite the difference in only one amino acid. Changing an amino acid leads to a change in the protein's insecticidal activity. In this way, protoxin and activated toxin Cry1Ia38 had the highest levels of toxicity on *G. molesta* larvae. Also, Cry1Ia38 protoxin and activated form resulted in 100% and 45% mortality of *O. nubilalis* larvae, respectively. While, in the case of Cry1Ia38 -I116V, only the protoxin of this protein was toxic for *G. molesta* and *O. nubilalis* larvae, and the activated toxin lost its insecticidal activity.

- The challenge of the oligomerization of Bt toxins in the sequential model: The association between the formation of oligomeric structures and toxicity of Cry1Ia protein.

In the fourth part, due to the unique features of CryII family toxins and the different mode of action of CryII toxin, the ability of this protein to form oligomeric structures was studied. Then, the relationship between the formation of oligomeric structures and the pathogenicity of Cry1Ia protein was questioned. Therefore, the oligomerization of Cry1Ia protein, after being incubated with BBMV from susceptible and non-susceptible hosts and also insect cell line was investigated for the first time by using the Western blot technique. The findings of this thesis indicate that Cry1Ia toxin formed oligomeric structures only after the incubation BBMV from coleopteran susceptible host, *L. decemlineata*. No oligomers were detected following incubation of Cry1Ia proteins with BBMV from susceptible and non-susceptible lepidopteran host besides lepidopteran cultured cells (Sf21 cell line). Therefore, following the mode of action based on the sequential model, the formation of an oligomeric structure may not be generalized for all Cry toxins and for all host insect species. Based on the results of present study, the

formation of an oligomer is an important, but not necessarily essential step, for the CryIIa toxin toxicity.

- Antifungal and antibacterial activity of Bt strains

In the sixth part of this dissertation, due to the finding of appropriate Bt strains for development of bio-insecticides, the antimicrobial activity of the Bt strains was also tested against phytopathogenic bacterium, *Erwinia* sp., and fungus. *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. Based on the results, no antimicrobial activity (antifungal and antibacterial) was observed in the tested Bt strains against selected plant pathogenic agents, *Erwinia* sp. and *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*.

- Occurrence of biochemical and physiological responses in Bt inoculated tomato plants.

In the seventh part of the dissertation, the physiological and biochemical effects of Iranian Bt strains on plant cells was studied. Tomato plants were inoculated with the mixture of spores and crystals of AzLp Bt strain through spraying on the plant foliage, and inoculation of rhizosphere. Different enzymatic and non-enzymatic parameters were measured including; catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), polyphenol oxidase (PPO) and Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and non-enzymatic parameters such as; protein content, total phenolic content, soluble carbohydrates and proline. In general, according to the results, inoculation of tomato plant with spores and crystals of Bt strain increased the activity of antioxidant enzymes. As a result, increased activity of the enzymes associated with the plant's immune system plays an important role in inducing plant resistance.

In summary, in this PhD dissertation, the characterization of Iranian Bt strains based on gene content, crystal protein composition, the spectrum of insecticidal and cytotoxic activity, antimicrobial activity, and metabolic and biochemical effect of Bt on plant cells were determined. These studies led to the introduction of the new *cryIIa38* gene from IE-1 Bt strain. The CryIIa38 protein has a great potential for controlling *G. molesta* and *O. nubilalis* larvae. Also, the CryIIa38 protein, due to its different mode of action in comparison with other three-domains Cry proteins, can be pyramided with other Cry

proteins to delay the occurrence of resistance in insects. On the other hand, selected Bt strains showed no antimicrobial activity against *Erwinia* sp. and fungi *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*. While, due to the physiological and biochemical effects tomato plant cells, they play an important role in inducing plant resistance and suppression of probable diseases. The results of this study led to the introduction of AzLp, IE-2 and IP-2, and Cry1Ia38 toxin from Bt, which had a great potential for controlling lepidopteran insect species and also had a favourable effect on host plants. Therefore, the use of three Bt strains of AzLp, IE-2 and IP-2 in Bt-based bio-insecticide and the use of Cry1Ia38 toxin are recommended for the production of future Bt products.

8.2. SUGGESTIONS

For further studies based on this thesis, the following suggestions can be considered:

- Primary screening focusing on the toxicity of Bt strains against other insect orders (Coleoptera and Diptera).
- Additional studies on the KhF Bt strain: Full genome sequencing of this strain, performing bioassay experiments with other insect pests from different orders (not only focusing on lepidopteran pest)
- Determination of damage to plant cells, by changing the permeability of the membrane, by electrolyte leakage.
- Screening based on toxic genes for other organisms (nematodes, mites, protozoa, etc.)
- Activation of Cry1Ia38 and Cry1Ia38 -I116V with midgut juice of susceptible insects
- Binding competition assays of Cry1Ia38 and Cry1Ia38 -I116V toxins in susceptible insects
- Labelling of protoxin Cry1Ia7, and an examination of oligomeric structures in protoxin.
- Investigating the endophytic activity of Bt strains in the host plant
- Investigating the metabolic effects of Bt endophytic on host plants.

REFERENCES

1. Abdullah MAF, Alzate O, Mohammad M, McNall RJ, Adang MJ, Dean DH. 2003. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 69:5343–5353.
2. Abe Y, Inoue H, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T, Kitada S. 2017. Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *J Invertebr Pathol* 142:71–81.
3. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.
4. Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2:875–877.
5. Alper M, Tatlipinar A, Civelek HS, Poyraz B, Güneş H, Çöl B, Özkan C. 2014. Distribution, occurrence of cry genes, and lepidopteran toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolated from fig tree environments in Aydın Province. *Turk J Agric* 38 2014: 898–907.
6. Alzate O, Osorio C, Florez AM, Dean DH. 2010. Participation of valine 171 in alpha-Helix 5 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in translocation of toxin into *Lymantria dispar* midgut membranes. *Appl Environ Microbiol* 76:7878–7880.
7. Anderson AJ, Rogers K, Tepper CS, Blee K, Cardon J. 1991. Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. *Physiol Mol Plant Pathol* 38:1–13.
8. Andow DA, Olson DM, Hellmich RL, Alstad DN, Hutchison WD. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 93:26–30.
9. Andreadis SS, Alvarez-Alfageme F, Sánchez-Ramos I, Stodola TJ, Andow DA, Milonas PG, Savopoulou-Soultani M, Castánera P. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 100:195–201.
10. Anilkumar KJ, Rodrigo-Simón A, Ferré J, Pusztai-Carey M, Sivasupramaniam S, Moar WJ. 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Appl Environ Microbiol* 74:462–469.

11. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
12. Aramideh S, Safaralizadeh MH, Pourmirza AA, Rezazadeh M. 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African J Microbiol Res* 4: 1224–1236.
13. Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem* 285:12497–12503.
14. Armada E, Probanza A, Roldán A, Azcón R. 2016. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *J Plant Physiol* 192:1–12.
15. Armada E, Azcón R, López-Castillo OM, Calvo-Polanco M, Ruiz-Lozano JM. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol Biochem PPB* 90:64–74.
16. Arrieta G, Espinoza AM. 2005. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. *Rev Biol Trop* 54:13–27.
17. Auh CK, Murphy TM. 1995. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-stimulated rose. *Cells Plant Physiol* 107:1241–1247.
18. Bach M, Schnitzler JP, Seitz HU. 1993. Elicitor-Induced Changes in Ca²⁺ Influx, K⁺ Efflux, and 4-Hydroxybenzoic Acid Synthesis in Protoplasts of *Daucus carota* L. *Plant Physiol* 103:407–412.
19. Baig DN, Mehnaz S. 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiol Res* 165:376–383.
20. Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension. *Cells Plant Physiol* 102:1341–1344.

21. Baranek J, Konecka E, Kaznowski A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *Biocontrol* (10):1–10.
22. Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE, Jacobsen BJ. 2003. Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1145–1153.
23. Barloy F, Lecadet MM, Delécluse A. 1998. Distribution of clostridial cry-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. *Curr Microbiol* 36:232–237.
24. Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287.
25. Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276–287.
26. Bel Y, Granero F, Alberola TM, Sebastian MJM, Ferre J. 1997. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Syst Appl Microbiol* 20:652–658.
27. Bel Y, Ferré J, Escriche B. 2011. Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *BMC Res Notes* 4:84.
28. Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, Manasherob R, Khamraev A, Troitskaya E, Dubitsky A, Berezina N, Margalith Y. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 63:4883–4890.
29. Bentur JS, Andow DA, Cohen MB, Romena AM, Gould F. 2000. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 93:1515–1521.
30. Bergamasco LCC, Nunes FLS. 2013. Applying Distance Histogram to retrieve 3D cardiac medical models. *AMIA . Annu Symp proceedings AMIA Symp* 2013:112–121.
31. Berón CM, Salerno GL. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51:779–794.
32. Bhattacharya RK. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* 27:21–28.

33. Bizzarri MF, Bishop AH. 2008. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microb Ecol* 56:133–139.
34. Bizzarri MF, Bishop AH. 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *J Invertebr Pathol* 94:38–47.
35. Blanco CA, Gould F, Vega-Aquino P, Jurat-Fuentes JL, Perera OP, Abel CA. 2009. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. *J Econ Entomol* 102:1599–1606.
36. Bolwell GP, Bindschedler L V, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53:1367–1376.
37. Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* 23:517–532.
38. Boncheva R, Dukiandjiev S, Minkov I, de Maagd RA, Naimov S. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *J Invertebr Pathol* 92:96–99.
39. Bottin A, Veronesi C, Pontier D, Esquerre-Tugaye MT, Blein JP, Rusterucci C, Ricci P. 1994. Differential responses of tobacco cells to elicitors from two Phytophthora species [cryptogein, defence induction, transduction pathway]. *Plant Physiol Biochem* 32:373–378.
40. Bourguet D, Chaufaux J, Séguin M, Buisson C, Hinton JL, Stodola TJ, Porter P, Cronholm G, Buschman LL, Andow DA. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor Appl Genet* 106:1225–1233.
41. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
42. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49 49:423–435.

43. Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1667:38–46.
44. Bravo A, I. G, H. P, BI. G-G, C. R-A, Pardo L, Soberón M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity *Microbial Biotechnology* . *Microb Biotechnol* 6:17–26.
45. Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965–4972.
46. Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41:423–431.
47. Bravo A, Soberón M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 26:573–579.
48. Brent KJ. 1986. Detection and monitoring of resistant forms: an overview, p. 298–312. *In* National Research Council, (Ed.), *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Academy Press, Washington, DC.
49. Broderick NA, Goodman RM, Handelsman J, Raffa KF. 2003. Effect of Host Diet and Insect Source on Synergy of Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by Zwittermi. *Environ Entomol* 32:387–391.
50. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. 2007. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185–2194.
51. Carmona D, Rodríguez-Almazán C, Muñoz-Garay C, Portugal L, Pérez C, de Maagd RA, Bakker P, Soberón M, Bravo A. 2011. Dominant negative phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins. *PLoS One* 6:e19952.
52. Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57:3057–3061.

53. Carillo P, Gibbon Y, 2011. Protocol: Extraction and Determination of Proline. Prometheus Wiki01/2011. http://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline.
54. Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J. 2016. Correction for Chakroun et al., Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:iii.
55. Charles JF, Nielsen-LeRoux C. 2000. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1:201–206.
56. Chen H, Zhang S, Zhen K, Wang X-F, Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2010. Relationship between the expression of occludin and tumor genesis and development in the gastric carcinoma. 26:1008–1011.
57. Chen XR, Wang XL, Zhang ZJ, Wang YC, Zheng XB. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 73:16e24.
58. Chen Y, Xu HS, Guo TL. 2018. Modulation of cytokine/chemokine production in human macrophages by bisphenol A: A comparison to analogues and interactions with genistein. *J Immunotoxicol* 15:96–103.
59. Chen Z, He F, Xiao Y, Liu C, Li J, Yang Y, Ai H, Peng J, Hong H, Liu K. 2015. Endogenous expression of a Bt toxin receptor in the Cry1Ac-susceptible insect cell line and its synergistic effect with cadherin on cytotoxicity of activated Cry1Ac. *Insect Biochem Mol Biol* 59:1–17.
60. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiol Res* 163:684–692.
61. Choi C, Sunwoo IN, Kim HS, Kim DI. 2000. Transient improvement of pyruvate metabolism after coenzyme Q therapy in Kearns-Sayre syndrome: MRS study. *Yonsei Med J* 41:676–679.
62. Choi JY, Lee JM, Lee JY, Kim SH, Lee MW, Han JK, Choi BI. 2007. Assessment of hilar and extrahepatic bile duct cancer using multidetector CT: value of adding multiplanar reformations to standard axial images. *Eur Radiol* 17:3130–3138.
63. Compant S, van der Heijden MGA, Sessitsch A. 2010. Climate change effects on

- beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73:197–214.
64. Constant CR. 1990. Injuries to the elbow. *J R Coll Surg Edinb* 35:S31-2.
 65. Crava CM, Bel Y, Jakubowska AK, Ferré J, Escriche B. 2013. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 43:924–935.
 66. Crava MC, Bel Y, Escriche B, Ehlers RU, Crickmore N. 2009. *Bacillus thuringiensis* susceptibility variation among *Ostrinia nubilalis* populations. *Insect Pathog Insect Parasit Nematodes IOBC/wprs Bull* 45:171–174.
 67. Crow RS. 1960. Aortic incompetence in ankylosing spondylitis. *Br Med J* 2:271–273.
 68. Damgaard PH. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment, p. 23–40. *In* Charles, J-F, Delécluse, A, Nielsen-LeRoux, C (eds.), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
 69. Dammak M, Jaoua S, Tounsi S. 2011. Construction of a *Bacillus thuringiensis* genetically-engineered strain harbouring the secreted Cry1Ia δ -endotoxin in its crystal. *Biotechnol Lett* 33:2367–2372.
 70. Davis D, Merida J, Legendre L, Low PS, Heinsteinst PF. 1993. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochem* 32:607–611.
 71. Davis JA, Guertin J, Cottrell DM. 1993. Diffraction-free beams generated with programmable spatial light modulators. *Appl Opt* 32:6368–6370.
 72. de Escudero I, Estela A, Escriche B, Caballero P. 2007. Ruiz and Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl Environ Microbiol* 73:337–340.
 73. de Goes K, Fisher MLD, Cattelan AJ, Nogueira MA, de Carvalho CGP, M. AL, J. 2012. de Oliveira and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Biotechnol* 22: 437–447.
 74. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17:193–199.
 75. de Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W, Bosch D. 2000. *Bacillus thuringiensis*

- δ -endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol* 66:1559–1563.
76. de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37:409–433.
 77. de Souza JD, de Oliveira CM, Ayres CF, Jain S, Lucena WA. 2009. Antonino , Fontes , and . Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl* 54: 467–473.
 78. de NM, Casados-Vázquez LE, García-Pérez AP, Barboza-Pérez UE, Bideshi DK. 2016. The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeospo.* *Microbiologyopen* 5:819–829.
 79. Deng J, Cui J, Jiang N, Zhang R, Zhang L, Hao X, Liang H. 2014. STAT3 regulation the expression of VEGF-D in HGC-27 gastric cancer cell. *Am J Transl Res* 6:756–767.
 80. Devlin PF, Rood SB, Somers DE, Quail PH, Whitelam GC. 1992. Photophysiology of the Elongated Internode (ein) Mutant of *Brassica rapa*: ein Mutant Lacks a Detectable Phytochrome B-Like Polypeptide. *Plant Physiol* 100:1442–1447.
 81. Devlin WS, Gustine DL. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 100:1189–1195.
 82. Dimkpa C, Weinand T, Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682–1694.
 83. Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H, Ferré J. 2017. Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria. *Toxins (Basel)* 9.
 84. Doke N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol* 23:359–367.
 85. Doke N, Ohashi Y. 1988. Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol* 32:163–175.

86. Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nat* 411:813–817.
87. Dong Y, Zhang X, Xu J, Zhang L, H. 2004. H, F, L & *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Env Microbiol* 70: 954–960.
88. Dong Y-H, Zhang X-F, Xu J-L, Zhang L-H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* 70:954–960.
89. Dong Z, Cmarik JL. 2002. Harvesting cells under anchorage-independent cell transformation conditions for biochemical analyses. *Sci STKE* 2002:pl7.
90. Dong-Jun S, Nguyen DMC, Song YS, Jung WJ. 2012. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J Microbiol Biotechnol* 22:407–415.
91. Downes K, Pekalski M, Angus KL, Hardy M, Nutland S, Smyth DJ, Walker NM, Wallace C, Todd JA. 2010. Reduced expression of IFIH1 is protective for type 1 diabetes. *PLoS One* 5.
92. Downes S, Parker TL, Mahon RJ. 2010. Characteristics of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) isolated from a field population. *J Econ Entomol* 103:2147–2154.
93. Dreywood R. 1946. Qualitative test for earbohydrate material. *Ind attd Eng Chem Ed* 18: 499.
94. Driss F, Kallassy-Awad M, Zouari N, Jaoua S. 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol* 99:945–953.
95. Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd Allah EF, Hashem A. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol* 8:2104.
96. Escriche B, Bel Y. 1995. Ferré J, Van Rie and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Lett* 132:1–7.
97. Escriche B, Silva FJ, Ferr, Eacute J. 1995. Testing Suitability of Brush Border Membrane

- Vesicles Prepared from Whole Larvae from Small Insects for Binding Studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA. *J Invertebr Pathol* 65:318–320.
98. Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J Biol Chem* 284:18401–18410.
99. Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME. 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 17:343–350.
100. Fang S, Wang L, Guo W, Zhang X, Peng D, Luo C, Yu Z, Sun M. 2009. *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of CryIAc protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Appl Environ Microbiol* 75:5237–5243.
101. Farinós GP, de la Poza M, Poza M, Crespo P, Ortego F, Castañera P. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol Exp Appl* 110:23–30.
102. Federici BA. 1991. Microbial insecticides. *Pestic Outlook* 2:22–28.
103. Federici BA, Park HW, Sakano Y. 2006. Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis*, p. 195–236. In Shively, JM (ed.), *Microbiology Monographs*.
104. Ferrandis MD, Frutos R, Bel Y. 1999. Juárez-Pérez VM, Ferré of cryI, cryII and crywithin *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Syst Appl Microbiol* 22:179–185.
105. Ferré J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5119–5123.
106. Ferre J, Rie J. 2002. Van Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 47 :501–533.
107. Fischer R, Schliess F, Häussinger D. 1997. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca²⁺ response in cultured rat astrocytes. *Glia* 20:51–58.
108. Flores-Cruz Z, Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. *Mol Plant Microbe Interact* 22:773–782.
109. Foyer CH, Descourvie'res P, Kunert KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell Environ* 17:507–523.

110. Fu Z, Sun Y, Xia L, Ding X, Mo X, Li X, Huang K, Zhang Y. 2008. Assessment of protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* strains by use of polyacrylamide gel block and mass spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:875–880.
111. Fuente-Salcio N, Alanís-Guzmán MG, Bideshi DK, SalcedoHernndez R, Bautista-Justo M, Barboza-Corona JE. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 190:633–640.
112. Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet* e1001248.
113. Garay C, Saab-Rincon G, Damian-Almazo JY, Gill SS, Bravo A. 2007. Jiménez-Juárez N. Muoz Gmez I Sobern M *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants Affect oligomer Form are nontoxic to *Manduca sexta* larvae *J Biol Chem* 282:21222–21229.
114. Garay J. 2009. Cooperation in defence against a predator. *J Theor Biol* 257:45–51.
115. Garay M, Bollo J, Balague C, Targarona E, Trias M. 2014. Gastrointestinal bleeding as a first symptom of a focal jejunal amyloidosis. *Cir Esp* 92:696–698.
116. Garcia-Suarez R, Verduzco-Rosas LA, Rincon-Castro MC, Delano-Frier JP, Ibarra JE. 2017. And . Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. *J Appl Microbiol* 122:1092–1100.
117. Gelernter, W D. FB. 1986. Federici cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*. *J Invertebr Pathol* 48:199–207.
118. Glazener JA, Orlandi EW, Baker CJ. 1996. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* 110:759–763.
119. Goma EZ. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol* 50:103–111.
120. Gomez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberon M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 513:242–246.
121. Gomis-Cebolla J, Ruiz de Escudero I, Vera-Velasco NM, Hernández-Martínez P,

- Hernández-Rodríguez CS, Ceballos T, Palma L, Escriche B, Caballero P, Ferré J. 2017. Insecticidal spectrum and mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Ca insecticidal protein. *J Invertebr Pathol* 142:60–67.
122. Gomis-Cebolla J, Wang Y, Quan Y, He K, Walsh T, James B, Downes S, Kain W, Wang P, Leonard K, Morgan T, Oppert B, Ferré J. 2018. Analysis of cross-resistance to Vip3 proteins in eight insect colonies, from four insect species, selected for resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 155:64–70.
123. Goodman CL, Wang AA, Nabli H, McIntosh AH, Wittmeyer JL, Grasela JJ. 2004. Development and partial characterization of heliothine cell lines from embryonic and differentiated tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40:89–94.
124. Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3519–3523.
125. Granados V, Ichazo S, Chávez J, Zamora J, Ochoa C, Cardoso G, Posadas C. 1994. [Fasting and postprandial lipids and lipoproteins during the chronic administration of antihypertensive drugs]. *Arch Inst Cardiol Mex* 64:469–475.
126. Grene R. 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants, p. . *In* Somerville, CR, Meyerowitz, ER (eds.), *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
127. Griffitts JS, Aroian R V. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27:614–624.
128. Gringorten JL, Sohi SS, Masson L. 1999. Activity spectra of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:299–303.
129. Grischechkina SD, Ovkandybin NVS. 2002. Fungistatic activity of different *Bacillus thuringiensis* subspecies [Russian]. *Микология и фитопатология* 36:58–62.
130. Grossi-De-Sa MF, Quezado dMM, Silva MS, Silva SM, Dias SC. 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem Mol Biol* 40.
131. Groulx N, McGuire H, Laprade R, Schwartz J-L, Blunck R. 2011. Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J*

- Biol Chem 286:42274–42282.
132. Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein CP. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Env Microbiol* 67:1090–1096.
 133. Guo C-H, Zhao S-T, Ma Y, Hu J-J, Han X-J, Chen J, Lu M-Z. 2012. *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa fused to a cellulase-binding peptide shows increased toxicity against the longhorned beetle. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1249–1256.
 134. Guo SY, Zhang CL, Lin XY, Zhang YR, He KL, Song FP, Zhang J. 2011. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Protein Expr Purif* 78:204–208.
 135. Guo S, Zhang Y, Song F, Zhang J, Huang D. 2009. Protease-resistant core form of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie: monomeric and oligomeric forms in solution. *Biotechnol Lett* 31:1769–1774.
 136. Hara H, Atsumi S, Yaoi K, Nakanishi K, Higurashi S, Miura N, Tabunoki H, Sato R. 2003. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. *FEBS Lett* 538:29–34.
 137. He XZ, Wang Q, Xu J. 2007. Influence of larval density on biological fitness of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *New Zeal Plant Prot* 60:199–202.
 138. Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto AB. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66:2627–2630.
 139. Hernández CS, Andrew R, Bel Y, Ferré J. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J Invertebr Pathol* 88:8–16.
 140. Hernández CS, Martínez C, Porcar M, Caballero P, Ferré J. 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. *J Invertebr Pathol* 82:57–62.
 141. Hernández-Martínez P, Vera-Velasco NM, Martínez-Solís M, Ghislain M, Ferré J, Escriche B. 2014. Shared binding sites for the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa in the African sweet potato pest *Cylas puncticollis* (Brentidae). *Appl Environ Microbiol* 80:7545–7550.
 142. Hernandez-Rodriguez CS, Boets A, Rie J, Ferre J. 2009. Van and Screening and

- identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Microbiol* 107:219–225.
143. Herrero S, González-Cabrera J, Ferré J, Bakker PL, de Maagd RA. 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J* 384:507–513.
144. Hofte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53:242–255.
145. Hollensteiner M, Augat P, Furst D, Esterer B, Gabauer S, Puschel K, Schrodler F, Schrempf A. 2017. Novel synthetic vertebrae provide realistic haptics for pedicle screw placement. *Conf Proc . Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf* 2017:46–49.
146. Huang X. 2009. An improved test of latent-variable model misspecification in structural measurement error models for group testing data. *Stat Med* 28:3316–3327.
147. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs* 1:31–50.
148. J. L-D, PE. C, SS. G, M. S, A. B. 2013. Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae . *Env Microbiol* 15:3030–3039.
149. Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar. 2012. Anti-oxidant modulation in response to gamma radiation induced oxidative stress in developing seedlings of *Psoralea corylifolia* L. *J Environ Radioact* 113:142–149.
150. Jayaraj J, Yi H, Liang GH, Muthukrishnan S, Velazhahan R. 2004. Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanz.* 111:115–125.
151. Jouzani GS, Abad AP, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:83–94.
152. Jouzani GS, Valijanlian E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2691–2711.
153. Juárez-Pérez VM, Ferrandis MD, Frutos R. 1997. PCR-based approach for detection of

- novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. Appl Environ Microbiol 63:2997–3002.
154. Jung YC, Mizuki E, Akao T, Côté JC. 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. J Appl Microbiol 103:65–79.
155. Kamenek LK, Kamenek D V, Terpilowski MA, Gouli V V. 2012. Antifungal action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin against pathogenic fungi related to *Phytophthora* and *Fusarium*. J Agric Technol 8:191–203.
156. Kar M, Mishra D. 1975. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol 57:315–319.
157. Kelley NJ, Schmeichel BJ. 2015. Thinking about Death Reduces Delay Discounting. PLoS One 10:e0144228.
158. Keshavarzi M. 2008. Isolation, identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. J Agric Sci 10: 493–499.
159. Khomkhum N, Leetachewa S, Angsuthanasombat C, Moonsom S. 2015. Functional assembly of 260-kDa oligomers required for mosquito-larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. Peptides 68:183–189.
160. Khorramnejad A, Bel Y, Hernández-Martínez P, Talaei-Hassanloui R, Escriche B. 2018. Insecticidal activity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* CryIIa protein. GMOs Integr Plant Prot IOBC-WPRS Bull 131:56–63.
161. Kim K, Lee YH, Kwon H, Kim JM, Kim IS, Park YK. 2004. Averaging algorithm based on data statistics in magnetocardiography. Neurol Clin Neurophysiol 2004:42.
162. Kleter GA, Bhula R, Bodnaruk K, Carazo E, Felsot AS, Harris CA, Katayama A, Kuiper HA, Racke KD, Rubin B, Shevah Y, Stephenson GR, Tanaka K, Unsworth J, Wauchope RD, Wong S-S. 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. Pest Manag Sci 63:1107–1115.
163. Knaak A.A.; Fiuza, L.M N. R. 2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. Braz J Microbiol 38:526–530.
164. Knowles BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. Adv In Insect Phys 24:275–308.
165. Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T, Shibuya N. 1995. EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein

- phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells . *Protoplasma* 188:138–142.
166. Kwa MS, de Maagd RA, Stiekema WJ, Vlak JM, Bosch D. 1998. Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C to cultured insect cells. *J Invertebr Pathol* 71:121–127.
167. Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251e275.
168. Lambert B, Peferoen M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. *Biosci - Am Inst Biol S.* 42:112–122.
169. Lecadet MM, Frachon E, Dumanoir VC, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thiéry I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 86:660–672.
170. Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 68:3919–3924.
171. Lenina NK, Naveenkumar A, Sozhavendan AE, Balakrishnan N, Balasubramani V, Udayasuriyan V. 2014. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol* 4:545–551.
172. Letourneau DK, Robinson GS, Hagen JA. 2003. Bt crops: predicting effects of escaped transgenes on the fitness of wild plants and their herbivores. *Environ Biosafety Res* 2:219–246.
173. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583–593.
174. Li A, Daggett V. 1996. Identification and characterization of the unfolding transition state of chymotrypsin inhibitor 2 by molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* 257:412–429.
175. Li DH-H, Winslow MM, Cao TM, Chen AH, Davis CR, Mellins ED, Utz PJ, Crabtree GR, Parnes JR. 2008. Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model. *Arthritis Rheum* 58:3192–3204.
176. Li JD, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815–821.
177. Li X, Ding X, Xia L, Sun Y, Yuan C, Yin J. 2012. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 at different growth phases. *Sci World J* 10.

178. Li X, Zhao F, Qiu X, Ren X, Mo X, Ding X, Xia L, Sun Y. 2018. The full-length Cry1Ac protoxin without proteolytic activation exhibits toxicity against insect cell line CF-203. *J Invertebr Pathol* 152:25–29.
179. Li Y, Zhang J, Zheng G, Sun Y, Hong SS, Xiong F, Wang S, Lee HR, Cui Y. 2015. Lateral and vertical two-dimensional layered topological insulator heterostructures. *ACS Nano* 9:10916–10921.
180. Likitvivanavong S, Katzenmeier G, Andsuthanasombat C. 2005. Asn183 in $\alpha 5$ is essential for oligomerization and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch Biochem Biophys* 445:46–55.
181. Lindner WA, Hoffman C, Grisebach H. 1988. Rapid elicitor-induced chemiluminescence in soybean cell suspension cultures. *Phytochem* 27:2501–2503.
182. Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. 2014. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins (Basel)* 6:2229–2238.
183. Liu XS, Dean DH. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng Des Sel* 19:107–111.
184. Liu Y, Zhang X, Xue Z, Sheng J. 2010. Dibutyl 5-[(4-ethoxycarbonylphenyl)diazanyl]benzene-1,3-dicarboxylate. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online* 66:o1730.
185. Lozzia GC, Manachini B. 2003. Susceptibility of *Ostrinia nubilalis* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Bull Insectology* 56:215–219.
186. Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Lindow S, Orduz S. 2007. Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. *J Appl Microbiol* 103:2593–2600.
187. Mahon RJ, Downes SJ, James B. 2012. Vip3A resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin. *PLoS One* 7:e39192.
188. Mandal CC, Gayen S, Basu A, Ghosh KS, Dasgupta S, Maiti MK, Sen SK. 2007. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. *Protein Eng Des Sel* 20:599–606.
189. Martínez C, Oguiza JA, Porcar M, Ruiz dEI, Estela A. 2006. Molecular and insecticidal

- characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 72:4796–4804.
190. Martínez C, Porcar M, López A, Ruiz de Escudero I, Pérez-Llarena FJ, Caballero P. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol Exp Appl* 111:71–77.
191. Martinez P, Escriche B. 2008. Hernández- Ferré, J., and Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 97:245–250.
192. Martins ES, Aguiar RWDS, Martins NF, Melatti VM, Falcão R, Gomes ACM, Ribeiro BM, Monnerat RG. 2008. Recombinant cryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J. Appl. Microbiol.* 104. *J Appl Microbiol* 104:1363–1371.
193. May MJ, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Involvement of Reactive Oxygen Species, Glutathione Metabolism, and Lipid Peroxidation in the Cf-Gene-Dependent Defense Response of Tomato Cotyledons Induced by Race-Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol* 110:1367–1379.
194. McConnell E, Richards AG. 1959. The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects. *Can J Microbiol* 5:161–168.
195. Mcgaughey WH, Beeman RW. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colonies of Indianmeal Moth and Almond Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 81:28–33.
196. Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405e410.
197. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J Appl Microbiol* 86:477–486.
198. Mohammad AM, El-Fatih MM, Helmy KG. 2013. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* strains and their efficacy against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Arch Phytopathol Plant Prot* 46:2420–2427.
199. Monnerat R, Martins E, Praça L, Dumas V, Berry C. 2012. Activity of a Brazilian strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against the cotton Boll Weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotrop Entomol* 41:62–67.
200. Monnerat RG, Soares CM, Capdeville G, Jones G, Martins ES, Praça L, Cordeiro BA,

- Braz SV, dos Santos RC, Berry C. 2009. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. *Microb Biotechnol* 2:512–520.
201. Nair MS, Dean DH. 2015. Composition of the Putative Prepore Complex of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Adv Biol Chem* 5:179–188.
202. Nazarian A, Jahangiri R, Jouzani GS, Seifinejad A, Soheilvand S, Bagheri O, Keshavarzi M, Alamisaeid K. 2009. Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *J Invertebr Pathol* 102:101–109.
203. Nurnberger T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D. 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449–460.
204. Ocelotl J, Sánchez J, Arroyo R, García-Gómez BI, Gómez I, Unnithan GC, Tabashnik BE, Bravo A, Soberón M. 2015. Binding and Oligomerization of Modified and Native Bt Toxins in Resistant and Susceptible Pink Bollworm. *PLoS One* 10:e0144086.
205. Ocelotl J, Sánchez J, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, Soberón M. 2017. ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. *Sci Rep* 7:2386.
206. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res* 29:427–433.
207. Oliveira RSD, Oliveiraneto OB, Moura HFN, Macedo L, Arraes FBM. 2016. Transgenic Cotton Plants Expressing Cry1Ia12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). *Front Plant Sci* 7.
208. Onofre J, Gaytán MO, Peña-Cardena A, García-Gomez BI, Pacheco S, Gómez I, Bravo A, Soberón M. 2017. Identification of Aminopeptidase-N2 as a Cry2Ab binding protein in *Manduca sexta*. *Peptides* 98:93–98.
209. Orlova M V, Smirnova TA, Ganushkina LA, Yacubovich VY, Azizbekyan RR. 1998. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Appl Environ Microbiol* 64:2723–2725.
210. Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodríguez-Almazán C, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem* 284:32750–32757.

211. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)* 6:3296–3325.
212. Palma L, Scott DJ, Harris G, Din S-U, Williams TL, Roberts OJ, Young MT, Caballero P, Berry C. 2017. The Vip3Ag4 Insecticidal Protoxin from *Bacillus thuringiensis* Adopts A Tetrameric Configuration That Is Maintained on Proteolysis. *Toxins (Basel)* 9.
213. Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A, Fems. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *Reviews* 37: 3–22.
214. Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 37:3–22.
215. Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88:91–142.
216. Pérez C, Muñoz-Garay C, L. P, Sánchez J, Gill SS, Soberón M, Bravo A. 2007. *Bacillus thuringiensis* spp. *Israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* 9:2931–2937.
217. Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA. 1990. Insect resistant cotton plants. *Nat Biotechnol* 8:939–943.
218. Pérombelon MCM. 1992. The genus *Erwinia*, p. 2899–2921. In Truper, HG, Dworkin, M, Harder, W, Schleifer, KH (eds.), *The prokaryotes* 2nd ed. Springer Berlin Heidelberg, New York.
219. Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:255–281.
220. Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat Res* 247:57–64.
221. Porcar M, Caballero P. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J Appl Microbiol* 89:309–316.
222. Portugal L, Gringorten JL, Caputo GF, Soberón M, Muñoz-Garay C, Bravo A. 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides* 53:292–299.

223. Portugal L, Muñoz-Garay C, Martínez de Castro DL, Soberón M, Bravo A. 2017. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. *Insect Biochem Mol Biol* 80:21–31.
224. Priest FG. 2000. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria, p. 1–22. *In* Charles, JF, Delecluse, A, Nielsen-Leroux, C (eds.), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
225. Rajamohan F, Hussain SR, Cotrill JA, Gould F, Dean DH. 1996. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J Biol Chem* 271:25220–25226.
226. anieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *J Exp Bot* 54:2529–2540.
227. Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, Bravo A. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim Biophys Acta* 1660:99–105.
228. Rausell C, Muñoz-Garay C, Miranda-CassoLuengo R, Gómez I, Rudiño-Piñera E, Soberón M, Bravo A. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 43:166–174.
229. Revina LP, Kostina LI, Dronina MA, Zalunin IA, Chestukhina GG, Yudina TG, Konukhova A V, Izumrudova A V. 2005. Novel antibacterial proteins from entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Can J Microbiol* 51:141–148.
230. Rodríguez-Almazán C, Zavala LE, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Pacheco S, Masson L, Soberón M, Bravo A. 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.
231. Ruiz de Escudero, Estela A, Porcar M, Martínez C, Oguiza JA. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae,

- Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 72:4796–4804.
232. Sadfi N, Chérif M, Fliss I, Boudabbous A, Antoun H. 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of fusarium dry rot of potato tubers. *J Plant Pathol* 83:101–117.
233. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9:283–300.
234. Sayyed AH, Gatsi R, Ibiza-Palacios MS, Escriche B, Wright DJ, Crickmore N. 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl Environ Microbiol* 71:6863–6869.
235. Scaramal Ricietto AN, Gomis-Cebolla J, Vilas-Boas GT, Ferré J. 2016. Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. *J Invertebr Pathol* 141:1–5.
236. Schaller A. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer Science.
237. Schnepf E, Crickmore N, Rie J V, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Am Soc Microbiol* 62: 775–806.
238. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775–806.
239. Seifinejad A, Jouzani GR, Hosseinzadeh A, Abdmishani C. 2007. Salehi , and Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biol Control* 44: 216–226.
240. Shakir SK, Irfan S, Akhtar B, Rehman SU, Daud MK. 2018. Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Ecotoxicology* (9):1–17.
241. Shrestha P, Mohan S, Roy S. 2015. Bug on the back: vertebral osteomyelitis secondary to fluoroquinolone resistant *Salmonella typhi* in an immunocompetent patient. *BMJ Case Rep* 2015.
242. Siegfried BD, Rangasamy M, Wang H, Spencer T, Haridas C V, Tenhumberg B, Sumerford D V, Storer NP. 2014. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field

- populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Manag Sci* 70:725–733.
243. Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, Handelsman J, He H, Clardy J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* 60:2023–2030.
244. Sivasupramaniam S, Head GP, English L, Li YJ, Vaughn TT. 2007. A global approach to resistance monitoring. *J Invertebr Pathol* 95:224–226.
245. Smaghe G, Goodman CL, Stanley D. 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45:93–105.
246. Soberon M, Gill SS, Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? . *Cell Mol Life Sci* 66:1337–1349.
247. Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* 49:597–600.
248. Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318:1640–1642.
249. Song F, Zhang J, Gu A, Wu Y, Han L, He K, Chen Z, Yao J, Hu Y, Li G, Huang D. 2003. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. *Appl Environ Microbiol* 69:5207–5211.
250. Stewart GS, Johnstone K, Hagelberg E, Ellar DJ. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem J* 198:101–106.
251. Stodola TJ, Andow DA, Hyden AR, Hinton JL, Roark JJ, Buschman LL, Porter P, Cronholm GB. 2006. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States Corn Belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 99:502–507.
252. Sun Y, Fu Z, Ding X, Xia L. 2008. Evaluating the insecticidal genes and their expressed products in *Bacillus thuringiensis* strains by combining PCR with mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74:6811–6813.
253. Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol* 31:510–521.
254. Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol* 26:199–202.

255. Tabashnik BE, Liu Y-B, Dennehy TJ, Sims MA, Sisterson MS, Biggs RW, Carrière Y. 2002. Inheritance of resistance to Bt toxin cryIac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol* 95:1018–1026.
256. Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J Econ Entomol* 107:496–507.
257. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick JA, Wu Y, Gao M, Huang F, Wei J, Zhang J, Yelich A, Unnithan GC, Bravo A, Soberón M, Carrière Y, Li X. 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci Rep* 5:15107.
258. Tailor R, Tippett J, Gibb G, Pells S, Pike D, Jordan L, Ely S. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol* 6:1211–1217.
259. Tanaka S, Endo H, Adegawa S, Kikuta S, Sato R. 2016. Functional characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors explains resistance in insects. *FEBS J* 283:4474–4490.
260. Thammasittirong A, Attathom T. 2008. PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *J Invertebr Pathol* 98:121–126.
261. Thiery I, Frachon E. 1997. Bacteria: identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, p. 55–75. *In* Lacey, LA (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London.
262. Thilagavathi R, Saravanakumar D, Ragupathi N, Samiyappan R. 2007. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathol Mediterr* 46:157–167.
263. Tingue N, Jacoby J, Ellar DJ. 2001. The α -helix residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* 67:5715–5720.
264. Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A. 2006. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:22–32.
265. Travers RS, Martin PA, Reichelderfer CF. 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 53:1263–1266.

266. Trovato M, Mattioli R, Costantino P. 2008. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rend Lincei* 19: 325–346.
267. Uribe D, Martinez W, Cerón J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 82:119–127.
268. Vachon V, Laprade R, Schwartz J-L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol* 111:1–12.
269. van Frankenhuyzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101:1–16.
270. Vardharajula S, Ali SZ, Grover M, Reddy G, Bandi V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact* 6:1–14.
271. Vargas RI, Miyashita D, Nishida T. 1984. Life History and Demographic Parameters of Three Laboratory-reared Tephritids (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 77:651–656.
272. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213–217.
273. Vega FE, Kaya HK, Tanada Y. 2012. *Insect Pathology*. Second edition. Academic Press, . San Diego, CA. 496p.
274. Vera-Estrella R, Blumwald E, Higgins VJ. 1992. Effect of Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum* on Tomato Suspension Cells: Evidence for the Involvement of Active Oxygen Species. *Plant Physiol* 99:1208–1215.
275. Vidal-Quist JC, Rogers HJ, Mahenthiralingam E, Berry C. 2013. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. *FEMS Microbiol Ecol* 86:474–489.
276. Vinoj G, Vaseeharan B, Thomas S, Spiers AJ, Shanthi S. 2014. Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Mar Biotechnol (NY)* 16:707–715.

277. Wang WJ, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. 2006. And . Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15:351–358.
278. Wang X, Li X, Shen A, Wu Y. 2010. Baseline susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. *J Econ Entomol* 103:843–848.
279. Wang Y, Yi L, Zhang Z, Fan H, Cheng X, Lu C. 2013. Overexpression of luxS cannot increase autoinducer-2 production, only affect the growth and biofilm formation in *Streptococcus suis*. *ScientificWorldJournal* :924276.
280. Willcoxon MI, Dennis JR, Lau SI, Xie W, You Y, Leng S, Fong RC, Yamamoto T. 2016. A high-throughput, in-vitro assay for *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J Biotechnol* 217:72–81.
281. Witt DP, Carson H, Hodgdon JC .1986. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to cultured Cf-1 cells does not correlate with *in vivo* activity towards spruce budworm larvae. In “Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology” (Samson RA, Vlak JM, Peters D, Eds.), pp. 3–6. Society for Invertebrate Pathology, San Diego, CA.
282. Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early response to pathogen infection. *Biochem J* 322:681e692.
283. Wolfersberger MG, Luthy P, Parenti P, Sacchi VF, Giordana B, Hanozet GM, A. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). . *Comp Biochem Physiol A Physiol* 86:301–308.
284. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH. 2000. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Lett* 473:227–232.
285. Wu Y. 2014. Detection and Mechanisms of Resistance Evolved in Insects to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Adv In Insect Phys* 47: 297–342.
286. Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* 6:2732–2770.
287. Yang P, Zhang L, Shi Q-J, Lu Y-B, Wu M, Wei E-Q, Zhang W-P. 2015. Nicotinamide

- phosphoribosyltransferase inhibitor APO866 induces C6 glioblastoma cell death via autophagy. *Pharmazie* 70:650–655.
288. Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, Mizuki E, Yu YM, Ohba M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can J Microbiol* 52:365–372.
289. Yilmaz E, Sezen H, Suzer S. 2012. Probing the charge build-up and dissipation on thin PMMA film surfaces at the molecular level by XPS. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:5488–5492.
290. Yudina, L B. BL. 1997. Activity of d-endotoxin of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against prokaryotes. *Microbiology* 66:17–22.
291. Yudina TG, Konukhova A V, Revina LP, Kostina LI, Zalunin IA, Chestukhina GG. 2003. Antibacterial activity of Cry- and Cyt-proteins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Can J Microbiol* 49:37–44.
292. Zhang CX, Hsieh T-S. 2007. Preparation of membrane proteins from *Drosophila* embryos. *CSH Protoc* 2007:pdb.prot4711.
293. Zhang H, Wu S, Yang Y, Tabashnik BE, Wu Y. 2012. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. *PLoS One* 7:e53418.
294. Zhang H, Tang M, Yang F, Yang Y, Wu Y. 2013. DNA-based screening for an intracellular cadherin mutation conferring non-recessive Cry1Ac resistance in field populations of *Helicoverpa armigera*. *Pestic Biochem Physiol* 107:148–152.
295. Zhang H, Chen Q, Chen L-W, Cao H, Zhang G-C, Chen D-Z. 2011. Intraoperative device closure of atrial septal defects in the older population. *J Cardiothorac Surg* 6:123.
296. Zhang J-M, Zhu W, Zhang Y, Xiao D, Yao Y. 2012. Tailoring magnetic doping in the topological insulator Bi₂Se₃. *Phys Rev Lett* 109:266405.
297. Zhang Y, Wang F, Fang L, Wang S, Fang G. 2009. Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects. *J Biomed Biotechnol* 2009:579175.
298. Zhao C, Jurat-Fuentes JL, Abdelgaffar HM, Pan H, Song F, Zhang J. 2015. Identification of a New cryII-Type Gene as a Candidate for Gene Pyramiding in Corn To Control *Ostrinia* Species Larvae. *Appl Environ Microbiol* 81:3699–3705.

299. Zhao J-Z, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat Biotechnol* 21:1493–1497.
300. Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu Y. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 40:113–118.
301. Zheng L-S, Ishii Y, Zhao Q-L, Kondo T, Sasahara M. 2013. PDGF suppresses oxidative stress induced Ca²⁺ overload and calpain activation in neurons. *Oxid Med Cell Longev* 2013:367206.
302. Zhou J, Chang S, Metaxas D, Mageras G. 2008. 3D-3D tubular organs registration based on bifurcations for the CT images. *Conf Proc . Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf 2008:5394–5397.*



دانشگاه والنسیا
دانشکده علوم زیستی
گروه ژنتیک



دانشگاه تهران
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

تنوع ساختار و عملکرد برخی توکسین‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* روی سلول‌های جانوری، گیاهی و میکروبی

پژوهش و نگارش

آیدا خرم‌نژاد

استادان راهنما

دکتر رضا طلایی حسنلویی

دکتر بالتازار اسکریچه سلر

استادان مشاور

دکتر وحید حسینی نوه

دکتر یولاندا بل کورتز

رساله برای دریافت درجه دکتری (PhD) مشترک در رشته حشره‌شناسی کشاورزی (گرایش اکولوژی و کنترل بیولوژیک) از دانشگاه تهران و رشته بیوتکنولوژی (گرایش کنترل آفات) از دانشگاه والنسیا

آبان ماه ۱۳۹۷

به نام خداوند بخشنده مهربان

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt)، موفق ترین بیمارگر حشرات با استفاده ای کاربردی در کنترل بیولوژیک آفات می باشد. شناسایی سویه های جدید از باکتری Bt، با هدف یافتن توکسین هایی که تخصص میزبانی متفاوت و دامنه ای حشره کشی وسیع تری دارند، برای مدیریت جمعیت آفات، امری ضروری و مهم به نظر می رسد. با توجه به اهمیت باکتری Bt، در کنترل میکروبی آفات، جدایه های بومی Bt، جمع آوری و بر اساس شدت بیماری روی لاروهای *Plodia interpunctella*، غربال شدند. ویژگی های سویه هایی که پتانسیل کنترلی متفاوتی روی شب پره ای هندی داشتند، از منظر ترکیب پروتئین های کریستال، محتوای ژنی، دامنه ای فعالیت حشره کشی و سلول کشی با تمرکز بر آفات بال پولکدار، فعالیت ضد میکروبی، تولید بتا-اگزوتوکسین و اثرات متابولیسمی و بیوشیمیایی روی سلول های گیاهی، به طور جامع تعیین گردید. بر اساس یافته های به دست آمده، سه سویه ای AzLp، IE-2 و IP-2، به دلیل زهر آگینی زیاد علیه لاروها و رده های سلولی آفات بال پولکدار، تعدد و تنوع پروتئین های حشره کش و عدم تولید بتا-اگزوتوکسین، به عنوان کاندیدهای مناسبی برای تولید حشره کش های زیستی بر پایه ی Bt معرفی شدند. با وجود این که تلقیح گیاه گوجه فرنگی با سوسپانسیون سویه های مورد مطالعه از باکتری Bt، موجب افزایش فعالیت آنزیم های مربوط به سیستم ایمنی و القای مقاومت در گیاه گردید، فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی علیه عوامل بیماری زای گیاهی مورد آزمون مشاهده نشد. ژن جدید *cryIIa38*، در نتیجه ی بررسی محتوای ژنی سویه ی Bt IE-1، شناسایی و با موفقیت همسانه سازی گردید. پس از بیان، استخراج و خالص سازی پروتئین CryIIa38، ویژگی های مولکولی، حشره کشی و سلول کشی این پروتئین ارزیابی شد. بر اساس نتایج، این پروتئین پتانسیل حشره کشی مناسبی علیه *Ostrinia nubilalis* و *Grapholita molesta* دارد. درک کامل و درستی از نحوه ی عملکرد توکسین های CryII، برای افزایش کارایی آن ها در کنترل آفات گیاهی، ضروری به نظر رسید. مطالعه ی تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین CryIIa و ارتباط آن با بیمارگری، نشان داد که بر اساس مدل اتصال متوالی نحوه ی اثر توکسین های Cry، تشکیل الیگومر، به عنوان مرحله ای مهم، اما نه لزوماً ضروری، برای همه ی توکسین های Cry عمومیت ندارد. این مسئله، امکان استفاده ی توأم توکسین های CryII با سایر پروتئین های Cry، در فرمولاسیون های بر پایه ی Bt و یا گیاهان تراریخته برای به تعویق انداختن بروز مقاومت را نشان می دهد.

واژگان کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، رده ی سلولی حشرات، LC-MS/MS، پروتئین CryIIa، تشکیل الیگومر، فعالیت ضد میکروبی، پاسخ بیوشیمیایی گیاه.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات	۱
۱-۱- مقدمه	۱
۲-۱- کلیات	۶
۱-۲-۱- باکتری <i>Bacillus thuringiensis</i>	۶
۲-۲-۱- نام‌گذاری، تعریف و طبقه‌بندی توکسین‌های Bt	۷
۱-۲-۲-۱- توکسین‌های Cry	۹
۳-۲-۱- نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry	۱۹
۴-۲-۱- نقش باکتری Bt در کنترل بیماری‌های گیاهی	۲۳
۵-۲-۱- اثر باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی	۲۴
فصل دوم: جداسازی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتری Bt	۲۷
۱-۲- مقدمه	۲۸
۲-۲- مواد و روش‌ها	۳۷
۱-۲-۲- سویه‌های باکتری‌های مورد استفاده	۳۷
۲-۲-۲- حشرات مورد استفاده	۳۷
۳-۲-۲- رده‌های سلولی مورد استفاده	۳۸
۴-۲-۲- نمونه‌برداری از خاک و میزبان	۳۹
۵-۲-۲- جداسازی باکتری Bt	۳۹
۶-۲-۲- نگهداری ذخایر کشت باکتریایی	۴۱
۷-۲-۲- تعیین ویژگی ریخت‌شناختی باکتری	۴۱
۸-۲-۲- رنگ‌آمیزی گرم	۴۲
۹-۲-۲- تست کاتالاز	۴۳
۱۰-۲-۲- مشاهده اسپور و تشخیص گروه <i>Bacillus</i>	۴۴
۱۱-۲-۲- غربال‌گری جدایه‌های باکتری Bt بر اساس زهرآگینی روی لاروهای شب‌پره‌ی هندی	۴۵
۱۲-۲-۲- مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی جدایه‌های باکتری Bt	۴۶
۱۳-۲-۲- تعیین محتوای پروتئینی کریستال‌های باکتری Bt به روش LC-MS/MS	۴۸

۵۰	۱۴-۲-۲- تعیین محتوای ژنی
۵۵	۱۵-۲-۲- بررسی بتا اگزوتوکسین
۵۶	۱۶-۲-۲- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt با تمرکز بر آفات بال‌پولک‌دار
۶۰	۳-۲- نتایج و بحث
۶۰	۱-۳-۲- جداسازی سویه‌های باکتری
۶۱	۲-۳-۲- غربال‌گری اولیه‌ی جدایه‌های باکتری Bt
۶۳	۳-۳-۲- مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی جدایه‌های باکتری Bt
۶۴	۴-۳-۲- تعیین محتوای پروتئینی کریستال‌های باکتری Bt به روش LC-MS/MS
۶۷	۵-۳-۲- تعیین محتوای ژنی
۶۹	۶-۳-۲- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt
۷۲	۷-۳-۲- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت سلول‌کشی سویه‌های باکتری Bt
۷۶	۸-۳-۲- بررسی تولید بتا اگزوتوکسین
۷۹	فصل سوم: ردیابی و همسانه‌سازی ژن جدید احتمالی در سویه‌های ایرانی باکتری Bt
۸۴	۲-۳- مواد و روش‌ها
۸۴	۱-۲-۳- یافتن ژن کاندید برای همسانه‌سازی
۸۵	۲-۲-۳- ژن <i>cryIaG</i>
۹۳	۳-۲-۳- ژن‌های <i>cryIHa</i> و <i>cryIHb</i>
۹۴	۴-۲-۳- ژن <i>cryIG</i>
۹۵	۵-۲-۳- ژن <i>cryIAd</i>
۹۶	۶-۲-۳- ژن <i>cryIIa</i>
۹۹	۷-۲-۳- همسانه‌سازی ژن <i>cryIIa38</i>
۱۰۹	۸-۲-۳- جهش‌زایی هدفمند
۱۱۳	۳-۳- نتایج و بحث
۱۱۳	۱-۳-۳- ژن <i>cryIaG</i>
۱۱۸	۲-۳-۳- ژن‌های <i>cryIHa</i> ، <i>cryIHb</i> ، <i>cryIG</i> و <i>cryIAd</i>
۱۲۰	۳-۳-۳- ژن <i>cryIIa</i>
۱۲۱	۴-۳- همسانه‌سازی ژن <i>cryIIa38</i>
۱۲۳	۱-۴-۳- جهش‌زایی هدفمند
۱۲۵	فصل چهارم: مقایسه ساختار و فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی پروتئین‌های CryIIa

۱۲۶	۱-۴- مقدمه.....
۱۲۹	۲-۴- مواد و روش‌ها
۱۲۹	۱-۲-۴- بیان پروتئین Cry1Ia38.....
۱۳۰	۲-۲-۴- استخراج و خالص‌سازی پروتئین Cry1Ia38.....
۱۳۱	۳-۲-۴- فعال کردن پیش‌توکسین Cry1Ia38 به وسیله تریپسین.....
۱۳۲	۴-۲-۴- بررسی اثر زهرآگینی پروتئین Cry1Ia38.....
۱۳۳	۵-۲-۴- بیان، استخراج، خالص‌سازی و فعال کردن موتانت Cry1Ia38-II16V.....
۱۳۳	۶-۲-۴- بررسی اثر زهرآگینی موتانت.....
۱۳۴	۷-۲-۴- بیان، استخراج، خالص‌سازی و فعال‌سازی پروتئین Cry1Ia7.....
۱۳۴	۸-۲-۴- بررسی فعالیت حشره‌کشی پروتئین Cry1Ia7.....
۱۳۵	۳-۴- نتایج و بحث.....
۱۳۵	۱-۳-۴- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38.....
۱۳۶	۲-۳-۴- فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia38.....
۱۳۷	۳-۳-۴- فعالیت سلول‌کشی پروتئین Cry1Ia38.....
۱۳۹	۴-۳-۴- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38-II16V.....
۱۴۰	۵-۳-۴- فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia38-II16V.....
۱۴۱	۶-۳-۴- فعالیت سلول‌کشی پروتئین Cry1Ia38-II16V.....
۱۴۳	۷-۳-۴- بیان، استخراج، خالص‌سازی و فعال‌سازی پروتئین Cry1Ia7.....
۱۴۳	۸-۳-۴- فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia7.....
۱۴۴	۹-۳-۴- فعالیت سلول‌کشی پروتئین Cry1Ia7.....
۱۵۳	فصل پنجم: مقایسه ساختار و فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی پروتئین‌های Cry1Ia.....
۱۵۴	۱-۵- مقدمه.....
۱۵۸	۲-۵- مواد و روش‌ها
۱۵۸	۱-۲-۵- آماده‌سازی پروتئین‌های Cry1Ia7 و Cry1Ab.....
۱۶۰	۲-۲-۵- حشرات مورد استفاده.....
۱۶۱	۳-۲-۵- جداسازی روده‌ی میانی و تهیه BBMV.....
۱۶۲	۴-۲-۵- نشان‌دار کردن با بیوتین.....
۱۶۳	۵-۲-۵- بررسی ساختارهای الیگومری.....
۱۶۷	۳-۵- نتایج و بحث.....

۱۶۷.....	۵-۳-۱- تشکیل ساختارهای الیگومری در پروتئین CryIIa
۱۶۷.....	۵-۳-۲- آماده‌سازی پروتئین‌های CryIIa7 و CryIAb
۱۶۸.....	۵-۳-۳- نشان‌دار کردن پروتئین CryIIa7 با بیوتین
۱۶۹.....	۵-۳-۴- تشکیل ساختارهای الیگومری با استفاده از رده‌ی سلولی
۱۷۰.....	۵-۳-۵- تشکیل ساختارهای الیگومری با استفاده از BBMV
۱۷۸.....	فصل ششم: بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتری Bt
۱۷۹.....	۶-۱- مقدمه
۱۸۱.....	۶-۲- مواد و روش‌ها
۱۸۲.....	۶-۲-۱- بررسی فعالیت ضد قارچی
۱۸۴.....	۶-۲-۲- بررسی فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های باکتری Bt
۱۸۵.....	۶-۳- نتایج و بحث
۱۸۵.....	۶-۳-۱- فعالیت ضد قارچی سویه‌های Bt
۱۸۹.....	۶-۳-۲- فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های Bt
۱۹۱.....	فصل هفتم: بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه گوجه‌فرنگی در پاسخ به باکتری Bt
۱۹۲.....	۷-۱- مقدمه
۱۹۷.....	۷-۲- مواد و روش‌ها
۱۹۷.....	۷-۲-۱- کشت گیاه گوجه‌فرنگی
۱۹۷.....	۷-۲-۲- تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی و خاک با سوسپانسیون باکتری Bt
۱۹۸.....	۷-۲-۳- نمونه‌برداری
۱۹۹.....	۷-۲-۴- بررسی پارامترهای آنزیمی و غیر آنزیمی
۲۰۶.....	۷-۳- نتایج و بحث
۲۰۷.....	۷-۳-۱- فعالیت آنزیم کاتالاز
۲۰۸.....	۷-۳-۲- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
۲۱۰.....	۷-۳-۳- فعالیت آنزیم فنیل‌لانین آمونیا-لیاز
۲۱۱.....	۷-۳-۴- فعالیت آنزیم پلیفنول اکسیداز
۲۱۲.....	۷-۳-۵- محتوای فنولی
۲۱۴.....	۷-۳-۶- غلظت کربوهیدرات محلول
۲۱۵.....	۷-۳-۷- محتوای پروتئینی کل
۲۱۷.....	۷-۳-۸- غلظت پرولین



فصل هشتم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها.....	۲۲۴
۸-۱- نتیجه‌گیری کلی.....	۲۲۵
۸-۲- پیشنهادها.....	۲۳۰

فهرست جداول

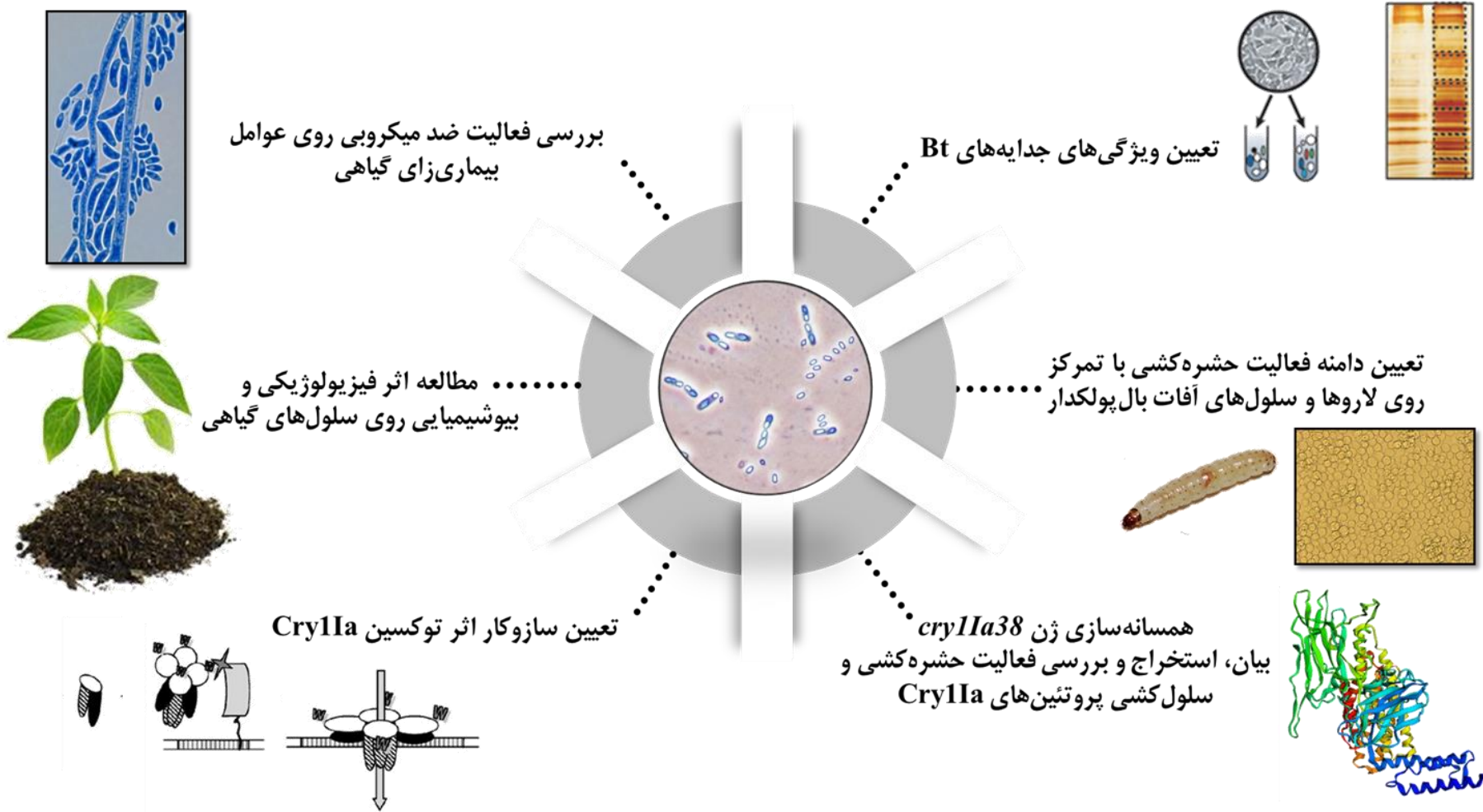
جدول ۲-۱- اسامی رده های سلولی مورد استفاده.....	۳۸
جدول ۲-۲- درصد اطمینان و ارزش های پروتئینی متناظر با آن.....	۴۹
جدول ۲-۳- فهرست و اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در این رساله.....	۵۲
جدول ۲-۴- غلظت و حجم مواد تشکیل دهنده مخلوط واکنش های زنجیره ای پلی مرز.....	۵۴
جدول ۲-۵- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز.....	۵۵
جدول ۲-۶- نتایج تجزیه ی پروبیت با استفاده از Polo-Plus، جهت محاسبه LC ₅₀ سویه AzLp.....	۶۱
جدول ۲-۷- گروه بندی سویه های Bt، بر اساس زهر آگینی آن ها روی لاروهای <i>P. interpunctella</i>	۶۱
جدول ۲-۸- زهر آگینی مخلوط اسپور و کریستال سویه های Bt، روی لاروهای شب پره ی هندی.....	۶۲
جدول ۲-۹- فهرست پروتئین های کریستالی حشره کش شناسایی شده توسط LC-MS/MS.....	۶۶
جدول ۲-۱۰- پراکنش ژن های <i>cry</i> ، <i>cvt</i> ، <i>vip</i> ، <i>sip</i> و <i>ps</i> در سویه های باکتری Bt.....	۶۸
جدول ۲-۱۱- فعالیت حشره کشی هفت سویه ی ایرانی باکتری Bt و سویه مرجع HD-1.....	۷۰
جدول ۲-۱۲- غلظت مؤثر ۵۰ درصد (EC ₅₀) توکسین های سویه های AzLp، IE-2 و IP-2، در برابر سلول های Sf21.....	۷۴
جدول ۲-۱۳- بررسی تولید بتا-اگزوتوکسین در سویه های باکتری Bt.....	۷۷
جدول ۳-۱- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در اولین PCR راه ژنگان پیمایی.....	۹۰
جدول ۳-۲- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز راه ژنگان پیمایی.....	۹۱
جدول ۳-۳- لیست تهیه شده از آنزیم های برشی اختصاصی برای هر کدام از ژن های <i>cryIAg1</i> و <i>cryIAa1</i>	۹۲
جدول ۳-۴- آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن های <i>cryIHa</i> و <i>cryIHb</i>	۹۴
جدول ۳-۵- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای تکثیر ژن <i>cryIG</i>	۹۵
جدول ۳-۶- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای تکثیر ژن <i>cryIG</i>	۹۵
جدول ۳-۷- آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر کل ژن <i>cryIIa</i>	۹۶
جدول ۳-۸- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای تکثیر ژن <i>cryIIa</i>	۹۶
جدول ۳-۹- آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک راه ژنگان پیمایی <i>cryIIa</i>	۹۷
جدول ۳-۱۰- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در اولین PCR راه ژنگان پیمایی.....	۹۷
جدول ۳-۱۱- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز راه ژنگان پیمایی، اولین PCR.....	۹۷
جدول ۳-۱۲- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز راه ژنگان پیمایی، دومین PCR.....	۹۸
جدول ۳-۱۳- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن <i>cryIIa38</i> برای همسانه سازی.....	۱۰۳
جدول ۳-۱۴- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای تکثیر کامل ژن <i>cryIIa38</i> در PCR.....	۱۰۳
جدول ۳-۱۵- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز تکثیر کامل ژن <i>cryIIa38</i>	۱۰۴
جدول ۳-۱۶- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای افزودن دم پلی A، به انتهای صاف ژن <i>cryIIa38</i>	۱۰۴
جدول ۳-۱۷- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در واکنش الحاق وکتور pGEM-Teasy.....	۱۰۵
جدول ۳-۱۸- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای غربالگری کلونی های نوترکیب به وسیله PCR.....	۱۰۶
جدول ۳-۱۹- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای غربالگری کلونی های نوترکیب.....	۱۰۶
جدول ۳-۲۰- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pGEM-Teasy.....	۱۰۷
جدول ۳-۲۱- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای هضم دوتایی وکتور pET-30a(+).	۱۰۸
جدول ۳-۲۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در واکنش الحاق وکتور pET-30a(+).	۱۰۹
جدول ۳-۲۳- آغازگرهای مورد استفاده برای انجام جهش زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره ای پلی مرز.....	۱۱۱

- جدول ۳-۲۴- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر پلاسמיד جهش یافته. ۱۱۲
- جدول ۳-۲۵- برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر پلاسמיד جهش یافته. ۱۱۲
- جدول ۳-۲۶- اطلاعات و توالی پپتیدهای منسوب به پروتئین CryIAg، با حدود اطمینان ۹۹ درصد. ۱۱۴
- جدول ۳-۲۷- اطلاعات مربوط به پروتئین‌های کاندید برای همسانه‌سازی. ۱۱۹
- جدول ۴-۱- میانگین (\pm خطای معیار) مرگ ناشی از فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین CryIIa38. ۱۳۷
- جدول ۴-۲- میانگین (\pm خطای معیار) مرگ ناشی از فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین CryIIa38-II16V. ۱۴۱
- جدول ۴-۳- میانگین (\pm خطای معیار) درصد مرگ ناشی از فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین CryIIa7. ۱۴۴
- جدول ۶-۱- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز. ۱۸۳
- جدول ۶-۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر ژن‌های کیتیناز. ۱۸۳
- جدول ۶-۳- برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن کیتیناز. ۱۸۳
- جدول ۷-۱- واکنش گیاهان متفاوت به حمله‌ی بیمارگرها. ۱۹۴
- جدول ۷-۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم CAT. ۲۰۰
- جدول ۷-۳- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم GPX. ۲۰۰
- جدول ۷-۴- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم APX. ۲۰۱
- جدول ۷-۵- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم SOD. ۲۰۲
- جدول ۷-۶- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم PPO. ۲۰۳
- جدول ۷-۷- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم PAL. ۲۰۳

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱-۱- الگوهای متفاوت از تولید کریستال در باکتری Bt..... ۷
- شکل ۱-۱-۲- ساختار سه دومینی توکسین Cry2Aa..... ۱۰
- شکل ۱-۱-۳- ساختار سه بعدی توکسین Cyt1Aa..... ۱۲
- شکل ۱-۱-۴- مراحل نحوه اثر باکتری Bt در مدل اتصال متوالی..... ۲۰
- شکل ۱-۱-۵- مولکول های گیرنده پروتئین های Cry1A..... ۲۲
- شکل ۱-۱-۶- نمایشی از مدل متعارف نحوه اثر توکسین های Cry در روده میانی حشره میزبان..... ۲۳
- شکل ۱-۲-۱- کلید شناسایی گروه های اصلی باکتری های باسیلی شکل..... ۴۲
- شکل ۲-۲-۱- ویژگی های ریخت شناسی گونه های جنس *Bacillus*..... ۴۴
- شکل ۲-۲-۳- تبدیل نمک تترازولیوم به ترکیب رنگی فورمازان..... ۵۸
- شکل ۲-۲-۴- الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین های موجود در کریستال..... ۶۴
- شکل ۲-۲-۵- حساسیت سلول های Hi5, HZGUT, UCR-SE و Sf21..... ۷۳
- شکل ۲-۲-۶- منحنی دز- پاسخ درصد زنده ماندن سلول های Sf21..... ۷۴
- شکل ۲-۲-۷- سلول های Sf21 تیمار شده با توکسین فعال شده سویه های AzLp, IE-2 و IP-2..... ۷۵
- شکل ۳-۱- مراحل انجام ژنگان پیمایی..... ۸۷
- شکل ۳-۲- توالی آدایتور و بلاکر مورد استفاده برای ژنگان پیمایی..... ۸۹
- شکل ۳-۳- نقشه و کتور همسانه سازی pGEM-Teasy..... ۱۰۱
- شکل ۳-۴- نقشه و کتور بیانی pET30a(+)...... ۱۰۲
- شکل ۳-۵- طرحی شماتیک از مراحل انجام جهش زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره ای پلی مرز..... ۱۱۰
- شکل ۳-۶- نتیجه ای واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای تکثیر ژن *cryIAg*..... ۱۱۵
- شکل ۳-۷- نتیجه ای واکنش های زنجیره ای پلی مرز اول (A) و دوم (B) برای تکثیر ژن *cryIAG*..... ۱۱۶
- شکل ۳-۸- برش محصولات PCR تکثیر ژن *cryIAG*..... ۱۱۸
- شکل ۳-۹- تکثیر ژن *cryII* با سه جفت آغازگر..... ۱۲۰
- شکل ۳-۱۰- نتیجه ای واکنش های زنجیره ای پلی مرز اول (A) و دوم (B) برای تکثیر ژن *cryII*..... ۱۲۱
- شکل ۳-۱۱- نتیجه تکثیر ژن همسانه سازی شده در وکتور نو ترکیب pET30a-CryIIa38..... ۱۲۲
- شکل ۳-۱۲- بررسی صحت همسانه سازی ژن *cryIIa38* در وکتورهای نو ترکیب pET30a-CryIIa38..... ۱۲۲
- شکل ۳-۱۳- تکثیر وکتور نو ترکیب pET30a-CryIIa38..... ۱۲۳
- شکل ۴-۱- ساختار سه بعدی توکسین Cry1Aa..... ۱۲۷
- شکل ۴-۲- بیان، خالص سازی و فعال کردن پروتئین CryIIa38..... ۱۳۶
- شکل ۴-۳- میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده ماندن سلول های Sf21 در مقابل CryIIa38..... ۱۳۸
- شکل ۴-۴- وضعیت سلول های Sf21 پس قرار گرفتن در معرض پیش توکسین و توکسین فعال شده CryIIa38..... ۱۳۹
- شکل ۴-۵- بیان، خالص سازی و فعال کردن پروتئین CryIIa38-II16V..... ۱۴۰
- شکل ۴-۶- میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده ماندن سلول های Sf21 در مقابل CryIIa38-II16V..... ۱۴۲
- شکل ۴-۷- وضعیت ظاهری سلول های Sf21 پس قرار گرفتن در معرض CryIIa38-II16V..... ۱۴۲
- شکل ۴-۸- بیان، خالص سازی و فعال کردن پروتئین CryIIa7..... ۱۴۳
- شکل ۴-۹- میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده ماندن سلول های Sf21 و Hi5 در مقابل توکسین فعال شده CryIIa7..... ۱۴۵

- شکل ۴-۱۰- وضعیت ظاهری سلول‌های Hi5 (A) و Sf21 (B)..... ۱۴۶
- شکل ۴-۱۱- هم‌ترازی توالی‌های اسید آمینه‌ای سه پروتئین Cry1Ia38، Cry1Ia38-II16V و Cry1Ia7..... ۱۵۰
- شکل ۴-۱۲- مقایسه‌ی ساختار سه بعدی توکسین‌های باکتری Bt..... ۱۵۱
- شکل ۵-۱- تهیه و خالص‌سازی توکسین‌های Cry..... ۱۶۸
- شکل ۵-۲- نتیجه‌ی نشاندار کردن توکسین Cry1Ia7 با بیوتین..... ۱۶۹
- شکل ۵-۳- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط سلول‌های Sf21..... ۱۷۰
- شکل ۵-۴- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط BBMV حاصل از *O. nubilalis*..... ۱۷۱
- شکل ۵-۵- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط BBMV حاصل از *L. botrana*..... ۱۷۲
- شکل ۵-۶- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط BBMV حاصل از *L. decemlineata*..... ۱۷۳
- شکل ۶-۱- فعالیت ضد قارچی سویه‌های باکتری Bt..... ۱۸۶
- شکل ۶-۲- تکثیر ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز در هفت سویه مورد بررسی از باکتری Bt..... ۱۸۸
- شکل ۶-۳- فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های باکتری Bt..... ۱۸۹
- شکل ۷-۱- گلدان‌های گیاه گوجه‌فرنگی که سطح خاک با سلفون پوشانده شده است..... ۱۹۸
- شکل ۷-۲- میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ۲۰۸
- شکل ۷-۳- میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ۲۰۹
- شکل ۷-۴- میانگین فعالیت آنزیم فنیلا‌لانین آمونیا-لیاز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ۲۱۱
- شکل ۷-۵- میانگین فعالیت آنزیم پلیفنول اکسیداز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ۲۱۲
- شکل ۷-۶- میانگین محتوای فنولی کل (\pm خطای معیار) بر حسب mM/ g fresh weight..... ۲۱۳
- شکل ۷-۷- میانگین غلظت کربوهیدرات محلول (\pm خطای معیار) بر حسب mg/g fresh weight..... ۲۱۴
- شکل ۷-۸- میانگین غلظت پروتئین کل (\pm خطای معیار) بر حسب mg/g fresh weight..... ۲۱۶
- شکل ۷-۹- میانگین غلظت پرولین کل (\pm خطای معیار) بر حسب nM/g fresh weight..... ۲۱۸



بررسی فعالیت ضد میکروبی روی عوامل
بیماری زای گیاهی

تعیین ویژگی های جدایه های Bt

مطالعه اثر فیزیولوژیکی و
بیوشیمیایی روی سلول های گیاهی

تعیین دامنه فعالیت حشره کشی با تمرکز
روی لاروها و سلول های آفات بال پولکدار

تعیین سازوکار اثر توکسین CryIIa

همسانه سازی ژن *cryIIa38*
بیان، استخراج و بررسی فعالیت حشره کشی و
سلول کشی پروتئین های CryIIa

شمای کلی رساله

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

به دلیل بروز مشکلات متعدد ناشی از کاربرد بی‌رویه‌ی حشره‌کش‌های شیمیایی علیه آفات، توسعه‌ی به‌کارگیری روش‌های کنترل بیولوژیک با بهره‌گیری از سه گروه شکارگرها، پارازیتوئیدها و بیمارگرهای حشرات، امری اجتناب‌ناپذیر است. در میان عوامل کنترل بیولوژیک، بیمارگرهای حشرات در نحوه‌ی کاربرد، هزینه تولید مناسب و تأثیر نسبتاً سریع، تا اندازه‌ای مشابه آفت‌کش‌های شیمیایی بوده و جایگاه خوبی را به خود اختصاص داده‌اند. باکتری‌های بیمارگر حشرات با قدرت تهاجمی مناسب به روده‌ی میانی و هموسل بدن حشرات، به‌ویژه اعضای دو خانواده‌ی *Bacillaceae* و *Streptococcaceae* متعلق به گروه باکتری‌های گرم مثبت، بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. ثابت شده که باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt)، باکتری گرم مثبت، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، و تولیدکننده‌ی اسپور درونی؛ موفق‌ترین و پرکاربردترین عامل کنترل میکروبی تجاری‌سازی شده می‌باشد (Federici, 1991; Raymond et al., 2010). حشره‌کش‌های بر پایه‌ی Bt و یا گیاهان تراریخته‌ای که توکسین‌های حشره‌کش Bt را بیان می‌کنند، به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی باشند (Bravo et al., 2011). در نتیجه، به دلیل اهمیتی که باکتری Bt در مقوله کنترل میکروبی حشرات دارد، موضوع و عنوان بررسی این رساله قرار گرفت.

باکتری Bt، تولید پروتئین‌های کریستالی می‌کند که برای بسیاری از حشرات، نماتدها، کنه‌ها، پروتوزوئرها و سلول‌های سرطانی انسان، زهرآگین هستند (Ohba, 2009; van Frankenhuyzen 2009; Schnepf et al., 1998; et al., 2009). هم‌چنین، این باکتری در طی مرحله‌ی رشد رویشی، پروتئین‌های ترش‌حی حشره‌کش، Vip و Sip، تولید می‌کند (Palma et al., 2014; Chakroun et al., 2016). به دلیل تخصص میزبانی و بی‌ضرر بودن توکسین‌های باکتری Bt برای محیط زیست و سایر موجودات غیر هدف، مطالعات زیادی در سراسر دنیا، بر جداسازی این باکتری از محیط‌ها و منابع متفاوت تمرکز کرده‌اند (Bel et al., 1997; Bravo et al., 1998; Uribe et al., 2003; Hernández et al., 2005; Berón and Salerno 2006; Thammasittirong and Attathom 2008; Seifinejad et al., 2008; Vidal-Quist et al., 2009; Djenane et al., 2017). اما، استفاده‌ی بیش از حد و غیر اصولی از محصولات بر پایه‌ی Bt، منجر به بروز مسئله‌ی مقاومت آفات نسبت به

توکسین‌های باکتری Bt شده است (Ferré et al., 1995). بنابراین، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری Bt، با هدف یافتن توکسین‌های جدیدی که تخصص میزبانی و یا دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی متفاوتی داشته باشند، برای مدیریت مسئله‌ی مقاومت حشرات، امری ضروری به نظر می‌رسد (Ferré et al., 1995; Juárez-Pérez et al., 1997).

به همین منظور، در این رساله نیز، ابتدا، روی جداسازی سویه‌های ایرانی باکتری Bt، از لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی، و همچنین از خاک جنگل، باغ درختان میوه، زمین‌های کشاورزی و مناطقی با پوشش گیاهی طبیعی تمرکز گردید. پس از غربال‌گری اولیه‌ی سویه‌های مورد بررسی، بر اساس شدت بیماری‌زایی آن‌ها روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی هندی (*Plodia interpunctella*) ویژگی سویه‌های انتخابی تعیین گردید. برای تعیین ویژگی‌های سویه‌های ایرانی از باکتری Bt، از روش‌های متفاوتی بهره جسته شده، تا اطلاعات جامعی از سویه‌های مورد بررسی فراهم آید.

در بسیاری از پژوهش‌های مربوط به شناسایی و تعیین ویژگی سویه‌های باکتری Bt، از روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز، به‌عنوان ابزاری مناسب برای ارزیابی محتوای ژنی و پیش‌گویی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های Bt استفاده شده است (Juárez-Pérez et al., 1997; Ferrandis et al., 1999). در این رساله نیز، محتوای ژنی سویه‌های باکتری Bt با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تعیین گردید. اما بدین دلیل که (۱) این روش دقیق و سریع، توانایی نشان دادن پروتئین‌های بیان شده و فراوانی نسبی هر یک از پروتئین‌ها درون اجسام کریستالی باکتری Bt را نداشت، (۲) الگوهای پروتئینی سویه‌های مورد بررسی حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE، نمی‌توانست اطلاعات دقیقی از میزان بیان ژن‌های شناسایی شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز را ارائه کند، (زیرا ممکن است چند پروتئین وزن مولکولی یکسانی داشته باشند) (Porcar and Caballero 2000)، در این رساله در کنار واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و الکتروفورز SDS-PAGE، از روش LC-MS/MS برای تعیین ترکیب پروتئین‌های موجود در اجسام کریستالی استفاده گردید. با در نظر گرفتن اهمیت برهم‌کنش بین توکسین‌های باکتری Bt، با پروتئین‌ها و گیرنده‌های سلول‌های پوششی روده‌ی میانی حشره‌ی میزبان، نتایج آزمون‌های زیست-سنجی اطلاعات تکمیلی از فعالیت حشره‌کشی سویه‌های مورد بررسی را فراهم آوردند. اما با توجه به زمان‌بر و

هزینه بر بودن آزمایش های زیست سنجی و نیاز به پرورش کلنی حشرات، به کار گرفتن آزمون هایی بر پایه ی سلول های حشرات، می تواند جایگزین بسیار مناسبی برای شناسایی فعالیت حشره کشی توکسین های باکتری Bt باشد (Kwa et al., 1998; Gringorten et al., 1999; Willcoxon et al., 2016). از دیگر مزایای استفاده از رده های سلولی حشرات این است که به پژوهش گران این امکان را می دهد که بدون در نظر گرفتن محدودیت ها و یا ممنوعیت های قوانین قرنطینه برای کار کردن با برخی از آفات، روی رده های سلولی حاصل از آنها تحقیق کنند.

در بررسی ویژگی های سویه های Bt، تعیین تولید بتا-اگزوتوکسین از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد، زیرا بررسی تولید این آنالوگ آدنوزین تری فسفات، مرحله ای ضروری قبل از تجاری سازی سویه های باکتری Bt، می باشد. در آخرین مرحله از بررسی ویژگی سویه های انتخابی از باکتری Bt، تولید و یا عدم تولید بتا-اگزوتوکسین مورد مطالعه قرار گرفت.

بنابراین در بخش اول این رساله، از تمامی روش های شرح داده شده، برای تعیین ویژگی های سویه های انتخابی از باکتری Bt بهره جسته شد و اطلاعات جامعی از محتوای ژنی، پروفایل و ترکیب پروتئین های کریستال، دامنه ی فعالیت حشره کشی و سلول کشی و تولید بتا-اگزوتوکسین در سویه های مورد بررسی، فراهم شد.

راهکارهای متفاوتی برای بهبود کارایی حشره کش های بر پایه ی Bt در نظر گرفته شده است. برای به حداکثر رساندن تأثیر توکسین های Bt، مقابله و یا حداقل به تعویق انداختن مسئله ی مقاومت آفات به توکسین های Bt، استفاده از مخلوطی از توکسین هایی، که در صورت امکان نحوه ی اثر متفاوتی دارند، به شدت توصیه می گردد. مطالعاتی که در بخش دوم این رساله انجام گرفت، منجر به معرفی ژن جدید (*cryIIa38*) در یکی از سویه های ایرانی باکتری Bt شد. بنابراین، در بخش سوم رساله، روی همسانه سازی ژن شناسایی شده، بیان، استخراج و خالص سازی پروتئین CryIIa38 و بررسی فعالیت حشره کشی و سلول کشی این توکسین تمرکز گردید. دلیل انتخاب این ژن، ویژگی های منحصر به فرد ژن های خانواده ی *cryII* بود که از مهم ترین این ویژگی ها

می‌توان به موارد زیر اشاره کرد؛ ۱) این ژن‌ها عموماً در سویه‌های باکتری Bt خاموش هستند اما می‌توانند در کشت‌های باکتری *Escherichia coli* بیان شوند. ۲) پروتئین‌های CryII، با وجود شباهت ساختاری با سایر پروتئین‌های CryI، همان‌طور که در همین گروه دسته‌بندی شده‌اند، توانایی تجمع در اجسام کریستالی را ندارند. ۳) پیش‌توکسین‌های CryII، وزن مولکولی بین ۷۰ تا ۸۱ کیلودالتون دارند که در بین افراد خانواده‌ی CryI که به‌طور معمول پیش‌توکسین‌هایی با اندازه‌ی ۱۳۰ کیلودالتون تولید می‌کنند، عجیب است. ۴) این پروتئین‌ها فعالیتی دوگانه علیه آفات بال‌پولکدار و سخت‌بالپوش دارند (Tailor et al., 1992; Choi et al., 2000). در نتیجه، در بخش چهارم این رساله روی پروتئین‌های CryIIa با توجه به اینکه نحوه‌ی اثر متفاوتی نسبت به سایر توکسین‌های شناخته شده دارند و از پتانسیل مناسبی برای استفاده هم‌زمان با سایر توکسین‌ها (چه در گیاهان تراریخته و چه در حشره‌کش‌های زیستی) برخوردار هستند، پژوهش‌های اختصاصی صورت گرفت.

فعالیت حشره‌کشی توکسین‌های باکتری Bt متکی بر بلعیده شدن اجسام کریستالی توسط لارو میزبان می‌باشد. در بخش میانی روده‌ی لارو حساس، کریستال‌ها به‌وسیله‌ی pH قلیایی حل و تبدیل به پیش‌توکسین می‌شوند. پیش‌توکسین‌ها توسط آنزیم‌های پروتئاز روده‌ی میزبان شکسته می‌شوند و توکسین فعال حاصل می‌گردد. در مدل اتصال متوالی (Bravo et al., 2007)، توکسین‌ها با الحاق به گیرنده‌های خاصی به صورت متوالی، باعث تخریب سلول‌های پوششی روده‌ی میزبان و نهایتاً مرگ حشره‌ی میزبان می‌شوند (Vachon et al., 2012). این‌طور به نظر می‌رسد که درکی روشن از نحوه‌ی اثر توکسین‌های Bt، امری لازم و ضروری برای افزایش و حفظ کارایی توکسین‌ها در برابر حشرات آفت، می‌باشد. بنابراین، در بخش پنجم رساله با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد خانواده‌ی ژن شناسایی شده، *cryII*، نحوه‌ی اثر توکسین CryIIa مورد مطالعه قرار گرفت.

دلته اندوتوکسین باکتری Bt، علاوه بر فعالیت حشره‌کشی، آنتاگونیست برخی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی، مانند *Erwinia* و *Pseudomonas* نیز می‌باشد (Yudina and Burtseva 1997). یافتن فرمولاسیونی بر پایه‌ی Bt که در کنترل آفات و بیمارگرهای گیاهی مؤثر عمل کند، به راحتی در خاک تجزیه شود و هزینه تولیدی نسبتاً مناسبی داشته باشد، به‌عنوان جایگزینی برای ترکیبات شیمیایی در گیاه‌پزشکی بسیار با ارزش است.

در نتیجه در بخش ششم از رساله، با توجه به یافتن سویه‌هایی مناسب از باکتری Bt با دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی وسیع روی آفات بال‌پولکدار بر آن شدیم که دامنه‌ی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های کاندید برای تولید انبوه نیز آزمون شود. بنابراین، در بخش ششم این رساله به اثر توکسین‌های سویه‌های ایرانی باکتری Bt روی بیمارگرهای گیاهی پرداخته شد.

هم‌چنین، مطالعات زیادی به پتانسیل باکتری Bt در تحریک رشد گیاه اشاره کرده‌اند (Dimpka et al., 2009; Compant et al., 2009). از سوی دیگر، در ارتباط با برهم‌کنش گیاه و باکتری Bt شواهد آزمایشی نشان می‌دهد که این باکتری توانایی انتقال و جابه‌جایی عمودی در گیاه، کلونیزه کردن و حضور به صورت فرم رویشی فعال در داخل گیاه را دارد (Vidal- et al., 2007; Maduell et al., 2007; Bizzarri and Bishop 2007, 2008). با وجود در دسترس بودن اطلاعات زیادی از باکتری Bt در ارتباط با گیاه، دانش کمی در مورد برهم‌کنش بین گیاه و باکتری Bt از نقطه نظر اثر این باکتری روی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سلول‌های گیاه میزبان در دست می‌باشد. در نتیجه، در بخش هفتم از این رساله، روی اثرات متابولیسمی و بیوشیمیایی سویه‌های ایرانی از باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی تمرکز شد.

به‌طور کلی، با ملاحظه‌ی آنچه که در بالا اشاره شد، موارد زیر جزء اهداف این رساله بود:

- تعیین ویژگی‌های حشره‌کشی و مولکولی جدایه‌های باکتری Bt
- بیان، استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌های CryIIa
- سنجش فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی توکسین‌های CryIIa
- تعیین سازوکار اثر توکسین CryIIa
- تخمین فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتری Bt
- تعیین اثرات متابولیسمی و بیوشیمیایی سویه‌های باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی

۱-۲- کلیات

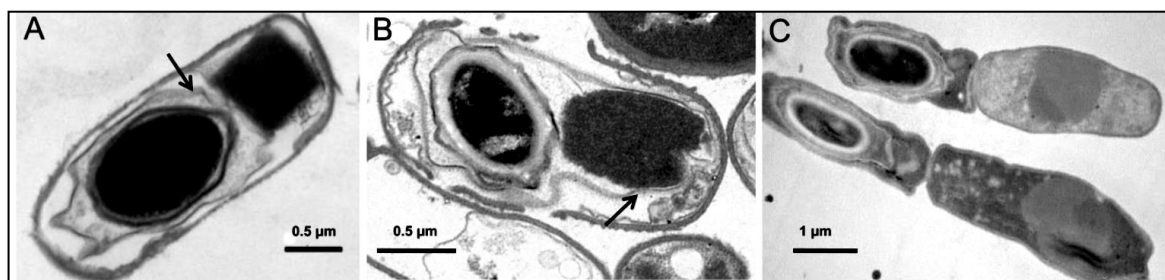
۱-۲-۱- باکتری *Bacillus thuringiensis*

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt)، یک باکتری همه‌جازی، گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، تشکیل دهنده‌ی اسپور درونی و مقاوم نسبت به حرارت می‌باشد که در طی مرحله‌ی سکون چرخه‌ی رشدی خود تولید کریستال‌های پروتئینی می‌کند. این گونه از خانواده‌ی Bacillaceae، در رده‌ی باکتری‌هایی که رشدشان به نور وابستگی ندارد (Scotobacteria)، شاخه‌ی باکتری‌های دارای لایه‌ی ضخیم پپتیدوگلیکان در دیواره‌ی خود (Firmicutes) و از سلسله‌ی پروکاریوت‌ها^۱ می‌باشد. به علاوه این گونه در گروهی از گونه‌های *Bacillus* قرار می‌گیرد که آندوسپورهای بیضوی انتهایی تولید می‌کند و این آندوسپور باعث تورم سلول باکتری میله‌ای شکل نمی‌شود (شکل ۱-۱). سویه‌های این گونه اغلب دارای تاژک جانبی بوده، متابولیسم از طریق تنفس، تخمیر و یا هر دو صورت می‌گیرد و pH مناسب رشد ۷/۵-۸ می‌باشد.

این باکتری در سال ۱۹۰۱ توسط یک زیست‌شناس ژاپنی به نام Ishiwata از کرم ابریشم آلوده جداسازی شد و *B. sotto* نام گرفت. در سال ۱۹۱۱ توسط Ernest Berliner، باکتری Bt از لاروهای آلوده‌ی بید آرد *Ephestia kuehniella* در منطقه‌ی Thuringia آلمان جداسازی گردید و *B. thuringiensis* نامیده شد. اولین بار در سال ۱۹۲۸، از کریستال‌های باکتری Bt برای کنترل کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* (Hüber (Lepidoptera: Crambidae)، استفاده گشت. اولین فرآورده‌ی تجاری بر مبنای Bt، به نام Sporing، در کشور فرانسه در سال ۱۹۳۸ تولید شد و برای کنترل کرم‌های آرد مورد استفاده قرار گرفت. با شناسایی توکسین‌های بیشتری از باکتری Bt انقلابی در محصولات تغییر یافته ژنتیکی بیان‌کننده‌ی ژن‌های *cry* رخ داد (Lambert and Peferoen, 1992). سنتز ژن‌های *cry* باکتری Bt منجر به معرفی گیاهان تراریخته‌ای شد که به آفات مقاوم بودند (Letourneau et al., 2003). از سال ۱۹۹۶ کشت محصولات تراریخته مقاوم به حشرات به نام محصولات Bt در سراسر دنیا گسترش یافت (Kleter et al., 2007).

¹ Prokaryote

باکتری Bt به‌عنوان یک باکتری تشکیل دهنده‌ی اسپور به‌طور وسیع در محیط زیست پراکنده شده است و به راحتی قابل جداسازی از خاک، آب، گیاهان، مدفوع حشرات، گرد و غبار، و محصولات انباری می‌باشد (Federici et al., 2006). وقتی مواد غذایی برای رشد باکتری کافی باشد، اسپورها جوانه می‌زنند و مرحله رشد رویشی را آغاز و از طریق تکثیر دوتایی تولیدمثل می‌کنند. باکتری به تکثیر خود ادامه می‌دهد تا زمانی که منابع غذایی برای ادامه‌ی رشد رویشی کافی نباشد. تحت شرایط نامساعد، باکتری Bt اسپورزایی می‌کند و در حین تولید اسپور می‌تواند یک یا چند کریستال پروتئینی با قابلیت حشره‌کشی تولید کند (de Maagd et al., 2003). باکتری Bt، عضو گروه *B. cereus sensu lato*، می‌باشد که علاوه بر پنج گونه‌ی باسیل دیگر را نیز شامل می‌شود؛ *B. weihenstephanensi*، *B. anthracis*، *B. mycoides*، *B. pseudomycooides* و *B. cereus sensu stricto*. کریستال‌ها ویژگی اصلی و وجه تمایز باکتری Bt از سایر گونه‌های مرتبط می‌باشد (Xu et al., 2014).



شکل ۱-۱ - الگوهای متفاوت از تولید کریستال در باکتری Bt. تصویر A؛ سویه‌ی HD73 از باکتری Bt را نشان می‌دهد، کریستال تولید شده در کنار اسپور قرار گرفته است. B؛ سویه‌ی YBT-020 و C؛ سویه‌ی LM1212 را نشان می‌دهد (Deng et al., 2014).

۱-۲-۲- نام‌گذاری، تعریف و طبقه‌بندی توکسین‌های Bt

در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ بلافاصله بعد از گسترش تکنیک تولید دی.ان.ای نوترکیب، پژوهشگران دریافتند که ژن‌های بیان‌کننده‌ی دلتا-اندوتوکسین‌های Bt روی پلاسمیدهای باکتری قرار گرفته‌اند. این یافته نقطه‌ی

آغازی برای تحقیقات و مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی توکسین‌های Bt بود. این مطالعات ژنتیکی منجر به همسانه‌سازی و توالی‌یابی تعدادی از ژن‌های دلتا-اندوتوکسین Bt شد. در نتیجه، به دلیل نیاز مبرم به یک سیستم نام‌گذاری برای سامان دادن به ژن‌های تازه یافت شده، اسامی متعدد و گیج‌کننده‌ای به پروتئین‌ها و ژن‌های دلتا-اندوتوکسین اطلاق گردید (Adang et al., 2014). تا اینکه در سال ۱۹۸۹ Hofte و Whitely روش نام‌گذاری جدیدی برای پروتئین و ژن‌های Bt بر اساس دامنه‌ی فعالیت این پروتئین‌ها پیشنهاد کردند. در این نام‌گذاری به پروتئین‌ها، Cry (برای پروتئین‌های کریستال‌ها) و Cyt (برای پروتئین‌های سیتولیتیک) اطلاق می‌شد. در این سیستم نام‌گذاری، توکسین‌های Bt، با اعداد رومی با توجه به دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی خود دسته‌بندی می‌شدند. برای مثال؛ توکسین‌های CryI، برای بالپولکداران، CryII برای بالپولکداران و دوبالان، CryIII برای سخت‌بالپوشان و CryIV به‌طور اختصاصی برای دوبالان زهرآگین بودند. یکی از مشکلات این سیستم نام‌گذاری، انتخاب نام برای یک توکسین جدید بود، زیرا ابتدا لازم بود تا آزمون‌های زیست‌سنجی با استفاده از توکسین جدید علیه تمام حشرات که پیش‌تر حساسیت آن‌ها به سایر توکسین‌ها مشخص شده بود، انجام گیرد (Palma et al., 2014). برای اجتناب از این مشکل‌ها کمیته نام‌گذاری توکسین‌های Bt، سیستم نام‌گذاری جدیدی در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد داد. در این سیستم توکسین‌های Bt بر اساس شباهت توالی اسیدهای آمینه نام‌گذاری می‌شوند. در این سیستم نام‌گذاری اسم یک توکسین از چهار سطح تشکیل شده است؛ برای مثال: توکسین Cry41Ab1، اعداد برای مشخص کردن سطح اول و چهارم مورد استفاده قرار می‌گیرند. از حروف بزرگ و کوچک به ترتیب برای تفسیر سطوح دوم و سوم استفاده می‌شود. بدین صورت پروتئین‌هایی که کمتر از ۴۵ درصد در توالی اسیدهای آمینه‌ی خود شباهت دارند، عدد اول جدیدی به خود اختصاص می‌دهند (برای مثال؛ Cry1 و Cry2). پروتئین‌هایی که کمتر از ۷۸ درصد شباهت دارند، در سطح سوم (حروف بزرگ) تفاوت دارند (برای مثال؛ Cry1A و Cry1B). پروتئین‌هایی که کمتر از ۹۵ درصد شباهت دارند در سطح سوم (حروف کوچک) متفاوت هستند (برای مثال؛ Cry1Aa و Cry1Ab) و در نهایت، برای تمایز پروتئین‌هایی که بیش از ۹۵ درصد شباهت دارند سطح چهارم (Cry1Aa1 و Cry1Aa2) تغییر می‌کند (Palma et al., 2014).

فعالیت بیماری‌زایی باکتری Bt را به کریستال‌های پروتئینی که این باکتری در طی اسپورزایی تولید می‌کند، نسبت می‌دهند. کریستال‌ها ویژگی اصلی و وجه تمایز باکتری Bt از سایر گونه‌های مرتبط به ویژه *Bacillus cereus* و حتی بقیه باسیل‌ها می‌باشد. این اجسام کریستالی یک یا چند پروتئین را در بر می‌گیرند که اکثر این پروتئین‌ها برای یک یا تعدادی از گونه‌های حشرات بسیار سمی می‌باشند. این پروتئین‌ها که به آن‌ها توکسین یا اندوتوکسین هم گفته می‌شود، عموماً در گروه توکسین‌های Cry (برای پروتئین‌های کریستالی) و توکسین‌های Cyt (برای پروتئین‌های سیتولیتیک) جای می‌گیرند.

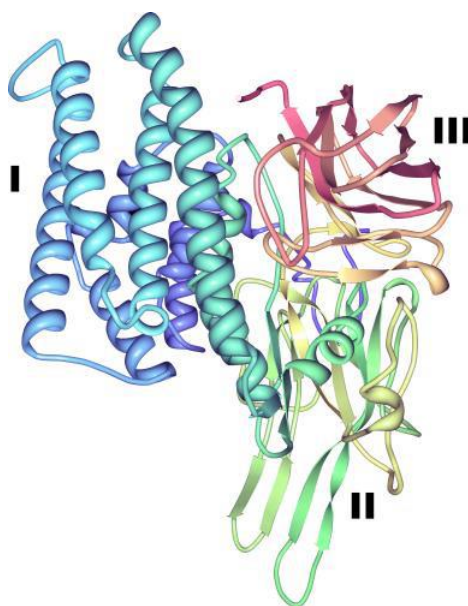
همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، باکتری Bt پروتئین‌هایی تولید می‌کند که برای بسیاری از حشرات، کنه‌ها، نماتدها، پروتوزوئرها و سلول‌های سرطانی انسان سمی هستند. این پروتئین‌ها می‌توانند در اجسام کریستالی پاراسپورال در مرحله‌ی سکون چرخه‌ی زندگی باکتری Bt تولید شوند، مانند پروتئین‌های Cry، Cyt و پاراسپورین، و یا اینکه در طی مرحله‌ی رشد رویشی باکتری ترشح شوند، مانند پروتئین‌های CryII، Vip و Sip (Van Frankenhuyzen 2009; Ohba et al., 2009; Palma et al., 2014; Chakroun et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018). در ادامه، به تعریف هر یک از توکسین‌های باکتری Bt، پرداخته می‌شود.

۱-۲-۲-۱- توکسین‌های Cry

اجسام کریستالی باکتری Bt از پروتئین‌های کریستالی تشکیل شده است که به آن‌ها توکسین‌های کریستالی یا دلتا-اندوتوکسین‌ها اطلاق می‌شود، و عموماً در دو گروه توکسین‌های Cry و Cyt جای می‌گیرند. توکسین‌های Cry برای اکثر حشرات سمی هستند، برخی از آن‌ها دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیعی دارند و درجات متفاوتی از بیماری‌زایی نسبت به موجود هدف از خود نشان می‌دهند. تاکنون کمیته نام‌گذاری توکسین‌های Bt حدود ۷۵ گروه از توکسین‌های Cry با سطح توصیفی اولیه متفاوت (از Cry1 تا Cry75) که زهرآگینی آن‌ها در برابر بال‌پولک‌داران، سخت‌بالپوشان، دوبالان، نماتدها، انگل‌های انسانی و حیوانی، برخی از حلزون‌ها و سلول‌های سرطانی انسانی مشخص شده، نام‌گذاری کرده است (<http://www.btnomenclature.info>). توکسین‌های Cry علی‌رغم تفاوت‌هایی در توالی اسیدهای آمینه و طول پیش‌توکسین، ساختار سه‌دومینی^۱ مشابهی دارند.

^۱ Domain

حضور یک تا پنج قطعه‌ی توالی‌های حفاظت شده از ویژگی‌های ثابت توکسین‌های Cry سه دومینی است (Pardo-Lopez *et al.*, 2013). در شکل زیر ساختار سه بعدی توکسین Cry2Aa نمایش داده شده است. اعداد لاتین در شکل ۱-۲، نشان‌دهنده‌ی دومین‌های پروتئین Cry2Aa می‌باشد؛ دومین I: دومین ایجاد کننده‌ی منفذ، دومین II؛ یا دومین مرکزی، درگیر برهم‌کنش‌های گیرنده-توکسین، دومین III؛ مسئول اتصال به گیرنده و تشکیل منفذ می‌باشد (Palma *et al.*, 2014).



شکل ۱-۲- ساختار سه دومینی توکسین Cry2Aa، دومین I: دومین ایجاد کننده‌ی منفذ، دومین II: دومین مرکزی که در برهم‌کنش‌های بین توکسین و گیرنده دخیل است، دومین III: در اتصال به گیرنده و تشکیل منفذ نقش دارد (Palma *et al.*, 2014).

دومین I واقع در انتهای آمینی پروتئین از مجموعه‌ای از هفت مارپیچ آلفا تشکیل شده که در آن مارپیچ مرکزی آبگریز آلفای پنج توسط شش مارپیچ آمفی‌پاتیک احاطه شده است. بخشی از دومین I در طی مرحله‌ی فعال‌سازی پروتئین‌های سه دومینی Cry پروتئولیز می‌گردد. این دومین مسئولیت اتصال توکسین به غشاء و تشکیل منفذ را به عهده دارد. دومین II یا دومین میانی، از سه صفحه‌ی بتای غیر موازی تشکیل شده است و

نقش مهمی در برهم‌کنش‌های بین توکسین و گیرنده، الیگومریزاسیون توکسین و الحاق به غشاء، بازی می‌کند. در نهایت، ساختار دومین III به صورت یک ساندویچ بتا می‌باشد که از دو صفحه‌ی بتای غیر موازی تشکیل شده است و در اتصال به گیرنده و تشکیل منفذ اهمیت دارد (Xu et al., 2014).

توکسین‌های Cry و Cyt باکتری Bt متعلق به گروهی از توکسین‌های باکتریایی هستند که به‌عنوان توکسین‌های تشکیل دهنده‌ی منفذ^۱ شناخته می‌شوند. این توکسین‌ها، پروتئین‌هایی محلول در آب هستند که دستخوش تغییرات ساختاری می‌شوند تا قابلیت اتصال و جابه‌جایی در غشای سلول‌های میزبان خود را داشته باشند (Bravo et al., 2007). دو گروه عمده از توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ وجود دارد؛ ۱. توکسین‌هایی با زنجیره آلفا^۲، که نواحی مارپیچ آلفا در غشای سلول میزبان منفذ ایجاد می‌کند و ۲. توکسین‌های با صفحه‌ی بتا^۳، که از طریق ساختارهای سنجاق سری صفحات بتا به غشای سلول میزبان متصل می‌شوند (Parker and Feil 2005). اولین گروه توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ شامل کولیسین، آگزوتوکسین آ، توکسین دیفتری و هم‌چنین توکسین‌های سه دومینی Cry می‌شوند. در حالی که آئرولیزین‌ها، آلفا-همولیزین‌ها، توکسین‌های وابسته به کلسترول و هم‌چنین توکسین‌های Cyt، متعلق به گروه دوم توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ هستند (Parker and Feil 2005). اما به طور کلی توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ با گیرنده‌هایی اختصاصی در سطح سلول‌های میزبان ارتباط دارند.

۱-۲-۲- توکسین‌های Cyt

توکسین‌های Cyt در ابتدا در زیرگونه‌ی *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* یافت شدند (Adang et al., 2014). توکسین‌های Cyt از لحاظ توالی اسیدهای آمینه شباهت کمی به توکسین‌های Cry دارند و عموماً برای دوبالان سمی هستند. توکسین‌های Cyt به توکسین‌هایی که خاصیت همولیتیکی (تجزیه‌ی کننده‌ی همولنف) دارند، اطلاق می‌شود. هم‌چنین، توکسین‌های Cyt خاصیت از بین بردن اریتروسیت‌ها (گلبول‌های قرمز) در مهره‌داران و در بی‌مهرگان را دارند (Mizuki et al., 1999). این گروه

¹ Pore-forming toxin (PET)

² α -helix

³ β -barrel

از توکسین‌ها به لحاظ ژنتیکی به سه گروه اصلی Cyt1، Cyt2 و Cyt3 که پیش‌تر به آن‌ها به ترتیب، CytA، CytB و CytC می‌گفتند، تقسیم می‌شوند (Schnepf et al., 1998). توجه به شکل ۱-۳ نشان می‌دهد که توکسین‌های Cyt از یک تک دومین با سه لایه از پروتئین‌های آلفا-بتا، تشکیل شده است (Palma et al., 2014). توکسین‌ها Cyt نیز مانند Cry به صورت پیش‌توکسین تولید می‌شوند و پس از فعال‌سازی بخش‌های کوچکی از انتهای آمینی و کربوکسیلی خود را از دست می‌دهند (Li et al., 1996). توکسین‌های Cyt با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون، نقش سینرژیستی برای برخی از توکسین‌های Cry دارند (Adang et al., 2014).



Cyt1Aa

شکل ۱-۳- ساختار سه بعدی توکسین Cyt1Aa (Palma et al., 2014).

توکسین‌های Cyt عموماً برای پشه‌ها و مگس‌های سیاه زهرآگین هستند. اما مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از زیرگونه‌های باکتری Bt، برای مثال؛ *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*، ژن‌های *cyt* دارند که برای دامنه‌ی وسیعی از حشرات شامل دوبالان، بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان زهرآگینی دارد (Guerchicoff et al., 2001). پیش‌توکسین‌های Cyt1A و Cyt2A بلعیده شده توسط حشره‌ی میزبان به وسیله آنزیم‌های پروتئاز دستگاه گوارش در انتهای کربوکسیلی و آمینی پروتئین هیدرولیز و به ترتیب، تبدیل به یک هسته‌ی مقاوم ۲۵ و ۲۳ کیلودالتونی می‌شوند. توکسین Cyt فعال شده تمایل زیادی به اتصال به لیپیدهای

غشای سلول‌های پوششی روده‌ی میانی حشره‌ی میزبان دارد. بر اساس مدل ارائه شده توسط López-Díaz و همکاران (۲۰۱۳)، اتصال توکسین فعال شده‌ی Cyt به لیپیدهای غشاء منجر به تغییر در ساختار توکسین، تشکیل ساختارهای الیگومری، ایجاد منفذ و نهایتاً مرگ سلول می‌شود.

۱-۲-۳- توکسین‌های پاراسپورین

برای چندین سال اعتقاد بر این بوده است که باکتری Bt فعالیت حشره‌کشی خود را در ارتباط با تکامل هم‌زمان با حشرات از طریق یک رابطه‌ی میزبان-انگلی به دست آورده است. این فرضیه برای بسیاری از محققین جذاب بوده است، اما بر اساس شواهد به دست آمده فرضیه‌ی جدیدی مطرح گردید که باکتری Bt به‌عنوان یک گونه، صرفاً و در وهله اول یک ساپروفیت محیط زیست است نه یک بیمارگر حشرات. این فرضیه با ملاحظه‌ی فزونی تعداد جدایه‌های طبیعی باکتری Bt بدون خاصیت حشره‌کشی نسبت به جدایه‌های دارای خاصیت حشره‌کشی، حمایت می‌شود. به عبارتی بیش از ۹۰ درصد جدایه‌های باکتری Bt که از خاک و یا از سطح شاخ و برگ گیاهان جدا می‌شوند، خاصیت حشره‌کشی ندارند. بنابراین، در اینجا این سوال مطرح می‌شود، این سویه‌هایی که خاصیت حشره‌کشی ندارند، چه فعالیت زیستی دارند که همچنان ناشناخته مانده است؟ پر واضح است که این پروتئین‌ها فعالیت بیولوژیکی دارند، اما این فعالیت تاکنون شناخته نشده است. فعالیت نماتدکشی و ضد میکروبی اجسام پروتئینی برخی از سویه‌های Bt که توانایی از بین بردن حشرات را ندارند، ثابت شده است (Yudina and Burtseva 1997). برای اولین بار در سال ۱۹۹۹، Mizuki و همکاران، فعالیت منحصر به فردی از توکسین‌های Bt گزارش کردند. به این ترتیب که اجسام پروتئینی غیر حشره‌کش برخی از سویه‌های Bt توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی انسان را دارند. پروتئین‌های تازه یافت شده، هم از لحاظ طیف سمیت و هم از نظر سطح فعالیت متفاوت هستند. این پروتئین‌ها که به جهت تفاوت‌های سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم، قادر به شناسایی سلول‌های سرطانی هستند و فقط وارد سلول‌های سرطانی می‌شوند، پاراسپورین (Parasporin) نام گرفتند. پاراسپورین‌ها، از سویه‌هایی از Bt که خاصیت حشره‌کشی ندارد، جداسازی شده‌اند. در ابتدا پاراسپورین به‌عنوان پروتئین‌های Cry شناسایی شد، اما فعالیت سلول‌کشی قابل توجه و افزایش تعداد اعضای این گروه، پاراسپورین‌ها را منحصر به فرد کرده است. کمیته‌ای برای طبقه‌بندی و نام‌گذاری این پروتئین‌ها در سال ۲۰۰۶

تشکیل گشت که نام پاراسپورین را به گروهی از پروتئین‌های Bt که توانایی از بین بردن حشرات را ندارند و تمایل به سلول‌های سرطانی دارند، نسبت دادند (Adang et al., 2014).

۱-۲-۴- توکسین‌های ترش‌حی

علاوه بر توکسین‌های Cry و Cyt که در طی مرحله‌ی اسپورزایی چرخه باکتری تولید می‌شوند، گروه دیگری از توکسین‌های Bt، در طی مرحله‌ی رشد رویشی به درون محیط کشت باکتری ترشح می‌شوند. این پروتئین‌های ترش‌حی حشره‌کش به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند: پروتئین‌های رویشی حشره‌کش (Vip^1) و پروتئین‌های ترش‌حی حشره‌کش (Sip^2). سیستم نام‌گذاری توکسین‌های Vip و Sip مشابه توکسین‌های Cry و Cyt می‌باشد که تاکنون چهار گروه اصلی از توکسین‌های Vip، از Vip1 تا Vip4، و یک گروه توکسین Sip گزارش شده است (Crickmore et al., 2014).

جایگاه ژن‌های vip هنوز شناخته نشده است، اما به نظر می‌رسد روی همان پلاسمیدهایی باشد که ژن‌های cry را رمز می‌کند. اولین پروتئین‌های رویشی حشره‌کش شناخته شده، Vip1 و Vip2 بودند که از لحاظ اندازه به ترتیب، ۱۰۰ و ۵۲ کیلودالتون وزن داشتند و برای برخی از سخت‌بالپوشان به شدت زهرآگین بودند (Hernandez-Rodriguez et al., 2009). گروه دیگر، Vip3، برای بال‌پولکداران سمی است و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۸۸/۵ کیلودالتون تولید می‌کند. نحوه‌ی اثر پروتئین‌های Vip همانند دلتا-اندوتوکسین پیچیده می‌باشد و از مراحل مجزایی تشکیل شده است. علائم آلودگی میزبان به پروتئین‌های رویشی حشره‌کش، مانند علائم ایجاد شده توسط پروتئین‌های کریستالی می‌باشد، با این تفاوت که ظهور علائم آلودگی ناشی از بلع کریستال‌ها، ۱۶ تا ۲۴ ساعت بعد از تغذیه رخ می‌دهد، در حالی که در مورد پروتئین‌های رویشی حشره‌کش، ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از تغذیه‌ی لاروها علائم ظاهر می‌گردد. دامنه‌ی میزبانی Vipها بسیار وسیع بوده و شامل آفات مهم کشاورزی که حساسیت کمتری نسبت به دلتا-اندوتوکسین نشان می‌دهند، نیز می‌شود. برای مثال؛ سمیت پروتئین‌های رویشی حشره‌کش علیه *Agrotis ipsilon*، ۲۶۰ برابر پروتئین‌های Cry1A می‌باشد. بر خلاف

¹ Vegetative insecticidal proteins

² Secreted insecticidal proteins

توکسین‌های Cry، پروتئین‌های رویشی حشره‌کش، اجسام کریستالی تشکیل نمی‌دهند، آن‌ها از همان سلول‌های اولیه به درون محیط کشت ترشح می‌شوند (Lee et al., 2003).

گروه پروتئین‌های ترشحی حشره‌کش، تنها یک عضو، Sip1Aa1، دارد که برای لاروهای آفات سخت‌بالپوش، زهرآگین می‌باشد. پروتئین Sip، اولین بار از رونشین محیط کشت سویه‌ی Bt EG2158، جداسازی گردید. ژن *sip1Aa1* ۱۱۰۴ جفت‌باز دارد و پروتئینی را به اندازه‌ی ۳۶۷ اسید آمینه و به وزن مولکولی ۴۱ کیلودالتون، رمز می‌کند (Palma et al., 2014).

۱-۲-۲-۵- سایر فاکتورهای زهرآگینی باکتری Bt

باکتری Bt به غیر از پروتئین‌های Cry، فاکتورهای دیگری با فعالیت حشره‌کشی مانند؛ تورینجینین^۱، زوئیترمایسین ای^۲، توکسین‌های Mtx و توکسین‌های شبه Bin، و هم‌چنین آنزیم‌هایی با خاصیت ضد میکروبی تولید می‌کند.

- بتا-اگزوتوکسین

بتا-اگزوتوکسین که به آن Thuringiensin و به اختصار Thu هم می‌گویند، متابولیت ثانویه و مقاوم به حرارت ترشح شده از باکتری Bt می‌باشد. بتا-اگزوتوکسین فعالیت حشره‌کشی برای طیف وسیعی از حشرات راسته‌های دوبالان، سخت‌بالپوشان و بال‌پولکداران، بال‌غشاییان، راست‌بالان و جوربالان و حتی برخی از گونه‌های نماتد، فعالیت میزبان‌کشی دارد. بر خلاف پروتئین‌های کریستالی حشره‌کش، Thu با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{32}O_{19}N_5P$ ، از آدنوزین، گلوکز، فسفریک اسید و گلوکونیک دی‌اسید تشکیل شده است، یک پروتئین نیست بلکه یک مولکول کوچک الیگوساکارید می‌باشد، که از آدنوزین، گلوکز، اسید فسفریک و گلوکونیک دی‌اسید به نسبت ۱:۱:۱ تشکیل شده است. وزن مولکولی Thu، ۷۰۱ کیلودالتون می‌باشد.

بتا-اگزوتوکسین مقاوم به حرارت است و در طی مرحله رشد رویشی بیان و به محیط کشت ترشح می‌شود. بتا-اگزوتوکسین اولین بار در سال ۱۹۵۹ توسط McConnell و Richards شناسایی شد، آن‌ها رونشین

¹ thuringiensin

² zwittermicin A

اتوکلاو شده از محیط کشت مایع باکتری Bt را به چندین گونه از حشره تزریق کردند و باعث مرگ حشرات شدند. مکانیسم حشره‌کشی Thu به خوبی شناسایی نشده است. با این وجود، می‌دانیم که Thu یک آنالوگ آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌باشد، که در فعالیت RNA پلی‌مراز اختلال ایجاد می‌کند. در واقع Thu سنتز RNA را از طریق رقابت با ATP برای اتصال به جایگاه باند شدن، مهار می‌کند، بنابراین پوست‌اندازی و شفیره شدن حشره را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علائم بیماری که توسط Thu در حشرات ایجاد می‌شود متفاوت از علائم توکسین‌های Cry است و تنها در طی پوست‌اندازی و شفیره شدن حشره دیده می‌شود.

سمیت Thu برای پستانداران برای مدت طولانی موضوع بحث بوده است و چندین تحقیق نشان داده‌اند که Thu برای پستانداران سمی می‌باشد. در نتیجه، بر اساس نظر سازمان سلامت جهانی (WHO) استفاده عمومی از Thu ممنوع اعلام شده است (Liu et al., 2014).

– آسیل هموسرین لاکتون (AHL) لاکتوناژ

بسیاری از بیمارگرهای باکتریایی مهم از جمله؛ *Burkholderia cepacia*، *Agrobacterium tumefaciens*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pantoea stewartii*، *E. carotovora*، *Erwinia chrysanthemi* برای سنجش تراکم جمعیت از سیستم حد نصاب حساسیت و در آن از آسیل هموسرین لاکتون (AHL) لاکتوناژ به‌عنوان مولکول‌های سیگنال، استفاده می‌کنند. این سیستم به بیمارگرها اجازه می‌دهد که به منظور حمله مؤثرتر به میزبان خود، بیان فاکتورهای زهرآگینی را تنظیم کنند. آنزیم AHL لاکتوناژ، ۲۵۰ اسیدآمینو و یک موتیف متصل شونده به روی دارد که در میان گروه‌های مختلف متالوهیدرولازها، حفاظت شده است (Dong et al., 2001). ژن AHL لاکتوناژ در بیش از ۵۰۰ سویه از باکتری Bt ردیابی شده و نتایج حاکی از آن بوده که ژن رمز کننده این آنزیم به طور گسترده‌ای در ژنوم باکتری Bt وجود دارد. نقش دقیق AHL لاکتوناژ در باکتری Bt و دلیل وجود ژن رمز کننده AHL لاکتوناژ در باکتری‌های گروه *B. cereus*، هنوز مشخص نیست (Zhou et al., 2008). برخی از پژوهش‌ها به نقش AHL لاکتوناژ به‌عنوان تقویت کننده‌ی قدرت رقابت گونه‌های *Bacillus* موجود در خاک اشاره می‌کنند (Vinoj et al., 2014). در توجیه وجود ژن AHL لاکتوناژ، فرضیه

رقابت مطرح می‌شود. به این ترتیب که سویه‌هایی از باکتری Bt با خاصیت حشره‌کشی از طریق فعالیت خودالقای-تخریبی باعث از بین رفتن باکتری‌های گرم مثبتی می‌شوند که در اکوسیستم‌های طبیعی همراه با آن‌ها وجود دارند (Lee et al., 2002). البته این فرضیه در تضاد با موضوع اثر باکتری Bt روی باکتری‌های گرم منفی از جمله *E. carotovora* است. از طرف دیگر، بسیاری از سویه‌هایی که فاقد این ژن هستند در همان اکوسیستم‌ها قادر به بقا هستند. در نهایت، تمام این یافته‌ها نشان می‌دهد که، AHL لاکتوناژ یک عملکرد خودتنظیمی دارد که برخی از رفتارهای Bt را به گونه‌ای که برای خود سودمند باشد، تغییر می‌دهد (Zhou et al., 2008).

Zwittermicin A -

زویترمیسین، یک آنتی‌بیوتیک است که دامنه فعالیت بسیار وسیعی دارد. این آنتی‌بیوتیک فعالیت زیادی در مقابل اوومیسیت‌ها و فعالیت متوسط در برابر برخی از باکتری‌های گرم منفی و بسیاری از قارچ‌های بیمارگر گیاهی، از جمله؛ *Ustilago* و *Helminthosporium*، *Fusarium* و *Alternaria* دارد (Silo-Suh et al., 1994). بسیاری از سویه‌هایی از *Bacillus* که زویترمیسین تولید می‌کنند، رشد باکتری *E. herbicola* را مهار می‌کنند. زویترمیسین آ، خاصیت مهارکنندگی قوی در جوانه‌زنی سیست‌ها و رشد لوله‌تندش دارد. علاوه بر دامنه وسیع فعالیت آنتی‌بیوتیکی زویترمیسین، هم‌چنین ثابت شده است که رابطه سینرژیستی بین زویترمیسین و توکسین‌های باکتری Bt وجود دارد (Broderick et al., 2003).

باکتریوسین^۱ -

باکتریوسین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی، کوچک و مقاوم به حرارت هستند که توسط باکتری‌ها سنتز و ترشح می‌شوند. باکتریوسین‌ها، از طریق رقابت در استفاده از مواد غذایی در دسترس، توانایی مهار و یا از بین بردن گونه‌های باکتریایی نزدیک به خود را دارند. باکتریوسین‌ها پپتیدهای کوچکی با وزن مولکولی ۳ تا ۱۲ کیلودالتون هستند که در طی مرحله سکون چرخه زندگی باکتری Bt تولید می‌شوند. باکتریوسین تولید شده توسط یک سویه مکزیکی از باکتری Bt فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیمارگر مهم گرم مثبت و گرم منفی؛ *B. cereus*.

^۱ Bacteriocin

Escherichia, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* و *Salmonella sp. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* دارد (Fuente-Salcido et al., 2008).

- کیتیناز

کیتین، پلی‌مر بلندی از واحدهای β -۱-۴-ان استیل گلوکز آمین است که در اسکلت خارجی بندپایان، دیواره سلولی قارچ‌ها و جلبک‌ها یافت می‌شود. باکتری‌ها توانایی سنتز کیتین را ندارند اما برخی از گونه‌های باکتریایی آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین ترشح می‌کنند و توانایی هیدرولیز این پلی‌مر و آزادسازی واحدهای ان استیل گلوکز آمین را، برای استفاده به‌عنوان منبع کربن و یا نیتروژن، دارند (Bhattacharya, 2007). آنزیم کیتیناز یکی از مهم‌ترین عوامل ضد قارچی شناخته شده در سویه‌های مختلف باکتری Bt است. سویه‌هایی از باکتری Bt که توانایی تولید آنزیم کیتیناز را دارند، فعالیت ضد قارچی زیادی در برابر *Fusarium roseum var. sambucinum* (عامل بیماری پوسیدگی خشک غده سیب‌زمینی)، *Penicillium chrysogenum*، *Sclerotium rolfisii*، *Urocystis tritici*، *Fusarium oxysporum*، *Rhizoctonia sp.* و *B. cinerea* از خود نشان می‌دهند (Salehi Jouzani et al., 2017).

- پروتئین‌های شبه 'Enhancin'

پروتئین‌های Enhancin موجود در سویه‌های باکتری Bt، ۲۰ تا ۳۰ درصد با Enhacin‌های ویروسی، شباهت دارند. Enhacin‌های ویروس، با از بین بردن موسین موجود در پرده‌ی دور غذا، باعث افزایش زهرآگینی ویروس‌ها می‌شوند. یکی از Enhacin‌های شناخته شده در باکتری Bt، Bel enhancin می‌باشد که در تجویز خوراکی همراه با توکسین Cry1Ac به لاروهای *Helicoverpa armigera*، باعث افزایش شدت بیماری‌زایی توکسین، می‌گردد (Fang et al., 2009).

¹ Enhancin-like proteins

۱-۲-۳- نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry

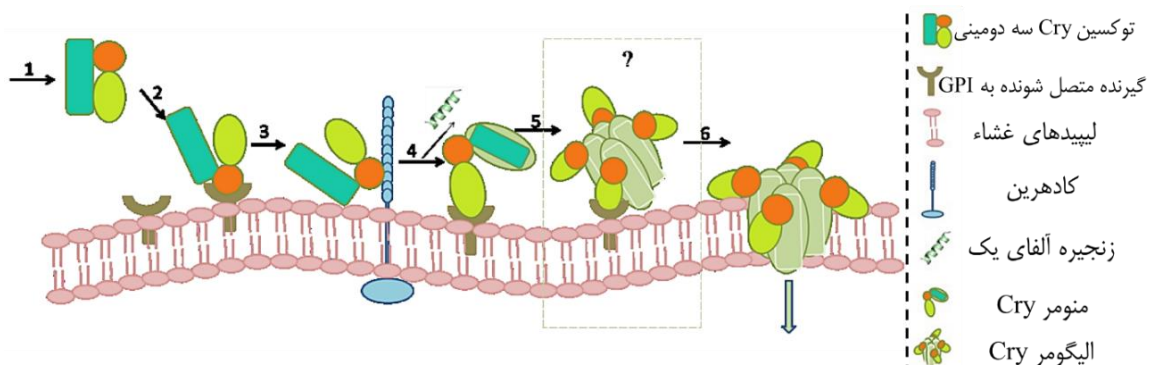
اولین مرحله در روند بیماری‌زایی باکتری Bt، پس از خورده شدن باکتری توسط میزبان حساس، انحلال کریستال‌ها از طریق شکستن پیوندهای دی‌سولفیدی و آزادسازی پیش‌توکسین‌های Cry می‌باشد. عوامل زیادی روی انحلال پیش‌توکسین‌های Cry در روده‌ی حشره‌ی میزبان تأثیر می‌گذارند، از جمله؛ شرایط فیزیکیوشیمیایی روده، ترکیب کریستال و فعالیت پروتئین‌های کمکی. ارتباط بین انحلال پیش‌توکسین و شرایط فیزیکیوشیمیایی روده‌ی میزبان، در برخی مواقع باعث تخصص میزبانی می‌شود که البته بستگی به پیوندهای دی‌سولفیدی و اسیدآمینه‌های غالب در توکسین‌های Cry دارد. سپس، مولکول‌های حل شده‌ی پیش‌توکسین در معرض پروتئازهای موجود در مایعات روده‌ی میزبان و/یا پروتئازهای داخلی باکتری Bt قرار می‌گیرند و هسته‌ی توکسین فعال شده که نسبت به پروتئولیزهای بعدی مقاوم است، به وجود می‌آید. این مرحله از فعال‌سازی توکسین، با استفاده از تریپسین و کیموتریپسین، متداول‌ترین آنزیم‌ها در مایعات روده‌ی حشرات، مدل‌سازی شده است.

در طی روند فعال‌سازی، اکثر پیش‌توکسین‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفتند، تبدیل به توکسین‌هایی با وزن مولکولی ۵۵ الی ۶۵ کیلوالتون می‌شوند که ۵۰۰ و ۴۳ اسیدآمینه، به ترتیب از انتهای آمینی و کربوکسیلی جدا می‌گردد. اما در مورد Cry4A و Cry11Aa، توکسین‌هایی که برای دوبالان سمی هستند و Cry8Da، توکسین مخصوص سوسک‌های Scarabeidae، طی روند فعال‌سازی دو قطعه‌ی پپتیدی تولید می‌شود که به هم پیوسته باقی می‌مانند تا یک مجموعه‌ی توکسین دوتایی را به وجود بیاورند. پروتئازهای داخلی Bt باعث تسریع روند فعال‌سازی پیش‌توکسین می‌شوند. سپس توکسین فعال شده از غشای دور غذایی عبور می‌کند، ماتریس دور غذا، باعث کاهش برهم‌کنش بین توکسین و جایگاه تأثیر می‌شود، در نتیجه روی حساسیت میزبان به باکتری تأثیر می‌گذارد. اما این نقش حفاظتی غشای دور غذا، با فعالیت آنزیم‌های کیتیناز (اندوکیتیناز یا اگزوکیتیناز) باکتری Bt از بین می‌رود (Ferre and Van Rie 2002; Bravo et al., 2004; Adang et al., 2014).

نشان داده شده است که، توکسین‌های حشره‌کش Cry سلول‌های پوششی روده را در حشرات میزبان مورد هدف قرار می‌دهند و این سد حشره‌ی میزبان را از بین می‌برند. گرچه مطالعات وسیعی در زمینه‌ی نحوه‌ی عمل توکسین‌های Cry صورت گرفته اما بحث در مورد جزئیات سازوکار برهم‌کنش بین پروتئین‌های موجود در

سطح سلول‌های پوششی روده‌ی میانی و توکسین‌های Cry که منجر به بیماری و مرگ می‌شود، همچنان بحث ادامه دارد (Vachon *et al.*, 2012). مشخص شده است که توکسین فعال شده، باید جایگاه‌هایی را در پروتئین‌های سلول روده‌ی میانی حشرات شناسایی و زهرآگینی خود را اعمال کند. همین مرحله‌ی اتصال توکسین به گیرنده، تخصصی بودن توکسین‌های Bt را مشخص می‌کند. از مدل‌های آزمایشگاهی برای مطالعه‌ی برهم‌کنش بین توکسین‌های Cry و سلول‌های روده‌ی میانی استفاده شده است. لیپیدها و پروتئین‌های متعددی به‌عنوان گیرنده‌ی توکسین‌های Cry پیشنهاد شده، لیکن اکثر داده‌های موجود به پروتئین‌های آمینوپپتیداز، آلكالین فسفاتاز و کاده‌رین به‌عنوان گیرنده‌ی توکسین باکتری اشاره کرده‌اند (Gomez *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2009).

مدل‌های متفاوتی برای روند بیماری‌زایی توکسین‌های Cry، ارائه شده است که در آن بین مدل اتصال متوالی، متعارف‌تر می‌باشد (شکل ۱-۴). مدل اتصال متوالی برای توکسین Cry1A و گیرنده‌های آن مورد بررسی قرار گرفته است (Bravo *et al.*, 2004)، نتایج نشان می‌دهد که اتصال اولیه و برگشت‌پذیر توکسین فعال شده‌ی Cry1A به گیرنده‌ی اولیه، بخش خارج سلولی کاده‌رین، منجر به بروز تغییراتی در ساختار توکسین می‌شود. کاده‌رین، پلی‌پپتیدی با اندازه ۷۲۰ تا ۷۵۰ اسید آمینه، از سه دومین تشکیل شده است؛ دومین خارجی بسته به گونه حشره از ۹ تا ۱۲ تکرار کاده‌رین Cadherin repeat یا CR تشکیل شده است، دومین بین‌غشایی و دومین درون سلولی (Bravo *et al.*, 2004).

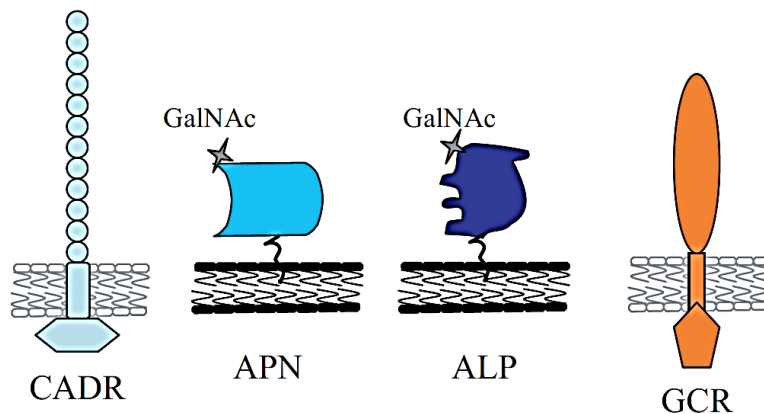


شکل ۱-۴ - مراحل نحوه‌ی اثر باکتری Bt در مدل اتصال متوالی. (۱) انحلال کریستال‌های بلعیده شده توسط پروتئازها در محیط قلیایی روده‌ی میانی، (۲) اتصال به گیرنده‌های متصل شونده به GPI، آمینوپپتیداز و

آلکالین فسفاتاز، (این مرحله صرفاً جهت موقعیت، مکان یابی و افزایش غلظت توکسین های فعال انجام می گیرد.)، (۳) اتصال توکسین فعال شده به کادهرین، (۴) شکست ماریپچ آلفای یک در انتهای آمینی، (۵) القای تشکیل ساختارهای الیگومری، (۶) نفوذ الیگومرها به درون غشاء که منجر به تشکیل منفذ و مرگ سلول می شود (Xu et al., 2014).

به دلیل اتصال توکسین به گیرنده های کادهرین، برش پروتئازی دیگری در انتهای آمینی توکسین که شامل زنجیره آلفای یک دومین I می شود، رخ می دهد. این برش باعث القای تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین می شود. این الیگومرهای ۲۵۰ کیلودالتونی تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده های ثانویه که شامل گلیکوزیل فسفاتیدیل-اینوزیتول، آمینوپپتیداز N و آلکالین فسفاتاز هستند، دارند. اتصال به پروتئین های آمینوپپتیداز و آلکالین فسفاتاز باعث افزایش غلظت الیگومرهای توکسین در غشای سلول های پوششی روده می شود. در ادامه، ساختارهای الیگومری متصل به گیرنده های ثانویه به سلول های پوششی روده میانی نفوذ می کنند و با تشکیل منفذ و باز کردن کانال های یونی، باعث مرگ سلول بر اثر شوک اسمزی می شوند (Bravo et al., 2007).

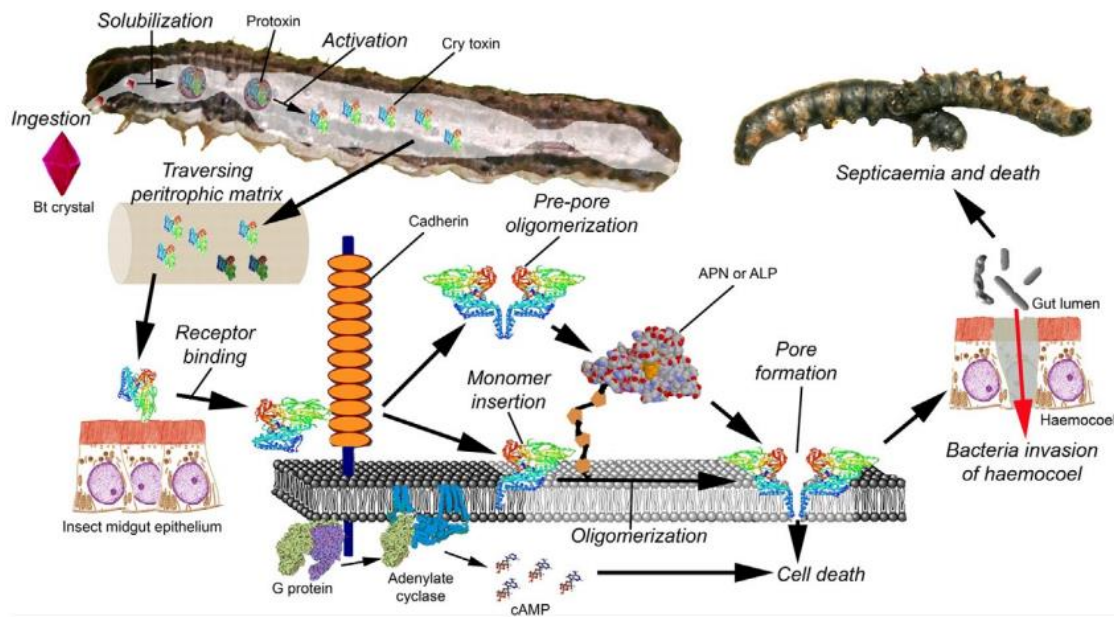
برای توکسین های Cry1A، حداقل چهار گیرنده ی پروتئینی متفاوت در حشرات بال پولکدار، شناسایی شده است (شکل ۱-۵)؛ کادهرین، آمینوپپتیداز، فسفاتازهای قلیایی و یک گلیکول متصل به گیرنده ۲۷۰ کیلودالتونی (Bravo et al., 2007).



شکل ۱-۵- مولکول‌های گیرنده پروتئین‌های Cry1A. CADR: گیرنده کادهرین، APN: آمینوپپتیداز-ان، ALP: فسفاتاز قلیایی و GCR: گیرنده ۲۷۰ کیلودالتونی متصل شونده به گلیکول^۱ (Bravo et al., 2007).

تخریب سلول‌های پوششی روده‌ی میانی توسط توکسین‌های Bt، راهی برای ورود اسپوره‌های باکتری Bt و باکتری‌های همزیست به همولنف ایجاد می‌کند. ورود اسپورها به همولنف منجر به جوانه‌زنی اسپوره‌های Bt می‌شود. در نهایت، پس از رشد و تکثیر سلول‌های رویشی Bt در همولنف میزبان، منجر به بروز عفونت خونی و مرگ حشره‌ی میزبان، می‌شود. شکل ۱-۶، جزئیات نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry را نشان می‌دهد.

^۱ 270 kDa glycol-conjugate receptor



شکل ۱-۶- نمایشی از مدل متعارف نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry در روده‌ی میانی حشره‌ی میزبان. بعد از بلع توکسین توسط لارو حساس، کریستال‌ها در مایعات روده‌ی میانی حل می‌شوند و پیش‌توکسین را به وجود می‌آورند پیش توکسین نیز تحت تأثیر آنزیم‌های پروتئاز، تبدیل به توکسین فعال می‌شود. مشابه همین روند، هنگام تغذیه‌ی لاروها از گیاهان تراریخته Bt اتفاق می‌افتد. سپس هسته‌ی توکسین Cry از پرده‌ی دور غذایی که قادر به نگه داشتن بسیاری از توکسین‌هاست (مولکول‌های تیره‌تر، در شکل)، عبور می‌کند. زمانی که توکسین به سلول‌های پوششی معده‌ی میانی لارو میزبان رسید، توکسین‌های Cry به گیرنده‌های کادهرین متصل می‌شوند، که منجر به فعال شدن مسیر درون سلولی مرگ سلول‌های میزبان می‌شود (در شکل با پروتئین G، آدنیلات سیکلاز و AMP حلقوی نشان داده شده است) و / یا بر اساس مدل اتصال پیاپی، بعد از پروتئولیز جزئی منومر توکسین و تشکیل ساختارهای الیگومری، الیگومر به آمینوپپتیداز و آلکالین فسفاتاز متصل می‌شود، و با ایجاد منفذ به درون غشای سلول وارد و منجر به مرگ اسمزی سلول می‌شود. با از بین رفتن سد سلول‌های پوششی روده‌ی میانی، باکتری‌ها به هموسل بدن میزبان حمله می‌کنند، که منجر به عفونت خونی و در نهایت مرگ میزبان می‌شود (Adang et al., 2014).

۱-۲-۴- نقش باکتری Bt در کنترل بیماری‌های گیاهی

علاوه بر خاصیت حشره‌کشی باکتری Bt، در سال‌های اخیر نقش این باکتری در کنترل بیماری‌های گیاهی نیز مورد توجه قرار گرفته است. تهیه فرمولاسیونی بر پایه Bt که توانایی کنترل آفات و بیماری گیاهی را به طور همزمان دارد، می‌تواند جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی باشد (Mohammad et al., 2013).

برخی از دلتا-اندوتوکسین‌ها علاوه بر خاصیت حشره‌کشی، در مقابل باکتری‌ها نیز فعال هستند (Kamenek et al., 2012). هم‌چنین شواهدی از فعالیت آنتی‌بیوتیکی مخلوط اسپور و کریستال Bt روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی وجود دارد (Grishechkina et al., 2002). گمان زده می‌شود که فعالیت‌های ضد میکروبی باکتری Bt تشابهی به نحوه عملکرد این باکتری در حشرات دارد. فعالیت ضدباکتریایی باکتری Bt برای *Erwinia* و *Pseudomonas* و ضدقارچی برای *Botrytis*، *Colletotrichum*، *Sclerotium*، *Phytophthora*، *Bipolaris*، *Fusarium* و *Alternaria* و *Rhizoctonia* ثابت شده است (Kamenek et al., 2012; Zheng et al., 2013; Shrestha et al., 2015; Salehi Jouzani et al., 2017). در نتیجه باکتری Bt پتانسیل مناسبی برای استفاده به‌عنوان قارچ‌کش و یا باکتری‌کش میکروبی دارد. به غیر از پروتئین‌های کریستالی و مابقی مواد با خاصیت حشره‌کشی، باکتری Bt ترکیبات فعالی تولید می‌کند که در کنترل بیماری‌های گیاهی اهمیت دارند. از آن جمله می‌توان به زویترمیسین آ، عاملی کارا و مؤثر در کنترل *Phytophthora medicaginis* عامل بیماری بوته‌میری یونجه (Silo-Suh et al., 1994)، آسیل هموسرین لاکتون (AHL) لاکتوزا، که باکتری‌های بیمارگر را از بین می‌برد (Dong et al., 2002)، کیتیناز یک عامل ضد قارچی مهم، فنجایسین^۱ یک لیپوپتید با توانایی کنترل قارچ‌های بیمارگر گیاهی و باکتریوسین به‌عنوان یک ماده نگهدارنده و پپتید ضد میکروبی طبیعی (Fuente-Salcido et al., 2008) اشاره کرد. این یافته‌ها دامنه فعالیت باکتری Bt را در کنار خاصیت حشره‌کشی گسترش می‌دهد و باعث درک بهتری از نقش Bt در اکوسیستم خاک می‌شود.

۱-۲-۵- اثر باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی

در مورد روابط گیاهان و باکتری Bt، می‌توان به جنبه‌های متفاوتی اشاره کرد که در طی این برهم‌کنش‌ها گیاه می‌تواند با فراهم آوردن آشیانه اکولوژیکی برای باکتری مفید باشد و یا اینکه با تولید برخی ترکیبات گیاهی اثر سوء روی شدت بیماری‌زایی باکتری Bt اعمال کند. از طرف دیگر، باکتری Bt نیز می‌تواند اثرات متفاوتی روی گیاه میزبان داشته باشد.

^۱ Fengycin

در پژوهش‌های پیشین، به وجود آشیانه‌های اکولوژیکی متنوع برای باکتری Bt در سطح گیاه، خاک و ریزوسفر اطراف گیاهان مختلف اشاره شده و به جداسازی باکتری Bt از این آشیانه‌ها اقدام شده است. هم‌چنین، مطالعات زیادی در ارتباط با نقش باکتری Bt به‌عنوان محرک رشدی گیاه، انجام گرفته است (Dimpka et al., 2010; Compant et al., 2009). نتایج این مطالعات، حاکی از آن بوده است که باکتری Bt، پتانسیل تحریک رشد گیاه را از طریق تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها و یا از طریق اثرگذاری روی تعادل اتیلن گیاه، افزایش مواد غذایی معدنی و تحریک گره‌زایی در حبوبات دارد. برخی از سویه‌های باکتری Bt، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که باعث افزایش رشد گیاه تحت شرایط تنش‌های غیر زنده، می‌شود. از جمله این ترکیبات می‌توان به؛ ای.سی.سی. دامیناز، ایندول-۳-اسید استیک، پرولین و آنزیم‌های حل‌کننده‌ی فسفات، اشاره کرد (Salehi Jouzani et al., 2017). هم‌چنین مشخص شده که سویه‌های مختلفی از باکتری Bt، توانایی حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های غیر زنده، فعالیت ضد میکروبی علیه قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی، تولید سیدروفور، تولید کیتیناز و القای مقاومت سیستمیکی در گیاه را دارند (Raddadi et al., 2008; de Goes et al., 2012).

از سوی دیگر، در ارتباط با برهم‌کنش گیاه و باکتری Bt، شواهد آزمایشی نشان می‌دهد که باکتری Bt توانایی انتقال و جابه‌جایی عمودی در گیاه، کلونیزه کردن و حضور به صورت فرم رویشی فعال (از لحاظ متابولیسمی) در داخل گیاه را دارد (Bizzarri and Bishop 2007, 2008; Maduell et al., 2008; Parca et al., 2012; Vidal-Quist et al., 2013; García-Suárez et al., 2017). اما، تأثیر این انتقال عمودی باکتری بر گیاه، هنوز شناخته نشده است.

در برهم‌کنش‌های گیاه-باکتری Bt، می‌توان به موارد متعددی اشاره کرد. پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که شدت بیماری‌زایی باکتری Bt برای برخی از آفات، روی گیاهان مختلف، متفاوت است. تانن موجود در گیاهان، باعث کاهش کارایی فرمولاسیون‌های Bt شده است. افزایش سطح نیکوتین به‌عنوان یک آلکانوئید در گیاه تنباکو، اثر باکتری‌کشی روی *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* دارد که در نهایت منجر به کاهش درصد مرگ در لاروهای *Manduca sexta*، گشته است. از سوی دیگر، برخی آلوکمی‌کال‌ها، شدت بیماری‌زایی Bt را افزایش می‌دهند (Shikano et al., 2018).

گیاهان در پاسخ به برخی از تنش‌های زنده و غیر زنده، مانند حمله‌ی بیمارگرها، ازدیاد انرژی نوری، خشکی و دمای پایین، تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر^۱ (ROS)، مانند آنیون‌های سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^{\bullet})، را افزایش می‌دهد که این افزایش منجر به آسیب سلول و غیر فعال شدن آنزیم‌ها می‌شود. در نهایت، اگر غلظت اکسیژن‌های واکنش‌پذیر به شدت افزایش یابد، به طوری که سیستم از بین‌برنده توانایی غیر سمی کردن آن‌ها را نداشته باشد، مرگ سلول رخ می‌دهد. در پی حمله‌ی بیمارگرها به گیاهان، چندین سیستم آنزیمی یافت شده‌اند که در متابولیسم اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، شرکت می‌کنند. در این بین، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز^۲ (SOD; EC 1.15.1.1)، کاتالاز^۳ (CAT; EC 1.11.1.6)، گایاکول پراکسیداز^۴ (GPX; EC 1.11.1.7) و آسکوربات پراکسیداز^۵ (APX; EC 1.11.1.11)، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این آنزیم‌ها، مانع از بین رفتن انسجام سلول‌های گیاهی به وسیله‌ی اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، در طی برهم‌کنش‌های گیاه-بیمارگر می‌شوند (Bolwell et al., 2002; Mittler 2002). تولید بیش از حد به نظر می‌رسد که اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، اولین سد دفاعی گیاه در برابر حمله‌ی بیمارگرها می‌باشد. این دفاع یا به صورت مستقیم باعث از بین رفتن بیمارگر شده و یا به صورت غیر مستقیم روی نفوذ بیمارگر به درون گیاه، تکثیر و بیماری‌زایی آن اثر می‌گذارد (Mandal et al., 2011). از سوی دیگر، تولید این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده، برای مثال آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، باعث افزایش فعالیت حشره‌کشی برخی از توکسین‌های باکتری Bt می‌شود. شدت بیماری‌زایی فرمولاسیون تجاری Bt، (Dipel®)، برای آفت *Helicoverpa zea*، زمانی که فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی زیاد بود، افزایش چشم‌گیری پیدا کرد. نکته‌ی قابل توجه آن‌که، برخی از سویه‌های باکتری Bt می‌توانند از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند؛ سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز باعث کاهش تنش‌های اکسیداتیو در گیاه شوند.

¹ Reactive Oxygen Species (ROS)

² Superoxide dismutase

³ Catalase

⁴ Guaiacol peroxidase

⁵ Ascorbate peroxidase

فصل دوم

جداسازی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتری Bt

فصل دوم: جداسازی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتری Bt

۲-۱- مقدمه

هدف از جداسازی باکتری Bt از منابع زیستی متنوع، یافتن جدایه‌هایی است که دامنه‌ی فعالیت جدیدی و یا زهرآگینی بیشتری داشته باشند. در نتیجه، پس از جداسازی باکتری Bt نیاز است ویژگی‌های جدایه‌های به دست آمده، تعیین گردد. به عبارتی، جدایه‌های باکتری Bt، باید بر اساس خصوصیات مختلفی توصیف، طبقه‌بندی و به‌عنوان سویه‌های مشخص معرفی شوند و در نهایت پتانسیل حشره‌کشی، سلول‌کشی، نماتدکشی، کنه‌کشی و یا فعالیت ضد میکروبی آن‌ها مشخص گردد. در پژوهش‌های مختلف، از روش‌های متفاوتی برای تعیین ویژگی‌های جدایه‌های باکتری Bt استفاده می‌شود. از آن جمله می‌توان به آزمون‌های بیوشیمیایی، سروتایپینگ^۱ بر اساس آنتی‌ژن‌های تاژک، تعیین محتوای ژنی^۲، تعیین توالی کل ژنوم، بررسی پروفایل پروتئینی، تعیین ترکیب و نوع پروتئین‌های کریستال، آزمون‌های زیست‌سنجی، بررسی فعالیت سلول‌کشی، مطالعه‌ی فعالیت ضد میکروبی و بررسی اثر سویه‌ها روی رشد و صفات فیزیولوژیکی گیاه اشاره کرد.

باکتری Bt توانایی زندگی در محیط‌های زیستی متنوعی دارد. جدایه‌هایی از باکتری Bt از زیستگاه‌های متفاوتی نظیر خاک، حشرات مرده و آلوده، گرد و خاک، محصولات انباری و برگ درختان جداسازی شده است. مطالعات بی‌شماری بر جداسازی باکتری Bt از منابع زیستی متنوعی در سراسر دنیا تمرکز کرده‌اند (Bel et al., 1997; Bravo et al., 1998; Uribe et al., 2003; Hernández et al., 2005; Arrieta and Espinoza 2005; Thammasittirong and Attathom 2008; Vida-Quist et al., 2009; Alper et al., 2014; Djenane et al., 2017). در ایران نیز، جدایه‌های بومی Bt از مناطق مختلف جداسازی، و بر اساس تنوع توکسین‌های Bt، شناسایی ژن‌های اختصاصی و فعال برای آفاتی از راسته‌های بال‌پولکداران، دوبالان و سخت‌بالپوشان، و هم‌چنین فعالیت نماتدکشی، تعیین ویژگی شدند (Salehi Jouzani et al., 2008a; Salehi Jouzani et al., 2008b; Seifinejad et al., 2008; Nazarian et al., 2009). در طی سال‌های ۱۳۸۰-۱۳۷۸ تعداد ۲۲۳۴ نمونه خاک زراعی از کلیه استان‌های ایران جمع‌آوری و تعداد ۱۲۸ جدایه باکتری Bt جداسازی گردید

¹ Serotyping

² Gene content

(مرزبان، ۱۳۸۴). کشاورزی^۱ در ایران در سال ۲۰۰۸، ۵۱۴ نمونه از خاک و حشرات مرده و آلوده، از ۸ استان ایران جمع آوری کرد، و موفق به جداسازی ۱۲۷ جدایه باکتری Bt شد. آرمیده^۲ (۲۰۱۰)، نیز ۴۸ جدایه ی بومی Bt از محیط های زیستی نظیر خاک، لاشه ی حشرات، بقایای گیاهی، آب های جاری و گرد و خاک انبارهای مواد غذایی در استان آذربایجان غربی جمع آوری کرد.

در تحقیق Mizuki و همکاران در سال ۲۰۰۰، قطعه ی ژنی به اندازه ی ۲۱۶۹ جفت باز پیدا شد که از ۷۲۳ اسید آمینه تشکیل شده است و وزن مولکولی آن ۸۱۰۵۲ دالتون می باشد. این قطعه ی ژنی مانند سایر پروتئین های Cry از پنج بلوک حفاظت شده تشکیل شده است، اما تشابه کمی (کمتر از ۲۵ درصد) به Cry های شناخته شده دارد. اثر این پروتئین جدید را روی چند رده ی سلولی بررسی کردند. سلول های انسانی مورد استفاده به این ترتیب بوده است: سلول های خونی سرطانی (leukemic T cell)، سلول های HeLa (سلول های سرطانی دهانه ی رحم)، سلول های سرطانی شش و سلول های سالم و عادی شش. در این تحقیق از دو کشت سلولی حشرات شامل سلول های کرم ابریشم (*Bombyx mori*) و سلول های پشه (*Aedes albopictus*) نیز استفاده شد. نتایج نشان داد که، زمانی که این پروتئین به وسیله ی پروتازها هیدرولیز و به قطعاتی با وزن مولکولی ۴۰ و ۶۰ کیلودالتون تبدیل شود، فعالیت سلول کشی از خود نشان می دهند. پروتئین پاراسپورین فعال شده توسط تریپسین، تنها برای سلول های سرطانی خونی و دهانه ی رحم کشنده است و هیچ تأثیری روی سلول های سالم و سلول های حشرات ندارد.

مقایسه ی الگوی باندهای پروتئینی، بررسی محتوای ژنی (ژن های *cry1*، *cry3*، *cry7* و *cry8*) و مطالعه ی پتانسیل حشره کشی با تمرکز روی دو آفت *Premnotrypes vorax* و *Spodoptera frugiperda*، معیار تعیین ویژگی های ۱۰۸ جدایه باکتری Bt، قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ژن *cry1* بیشترین فراوانی را در بین ژن های مورد بررسی داشته است و برخی از سویه های مورد بررسی، زهر آگینی زیادی برای آفات هدف، داشتند (Uribe et al., 2003).

¹ Keshavarzi

² Aramideh

با هدف یافتن سویه های جدید، جدایه هایی از باکتری Bt، از نمونه هایی از خاک، گرد و غبار، حشرات مرده و تار عنکبوت، از مناطق مختلف در کشور آرژانتین، جداسازی شد. ویژگی های جدایه های به دست آمده از نقطه نظر پروفایل پروتئینی و محتوای ژنی با تمرکز روی ژن های *cry1* و *cry3*، تعیین گردید. پتانسیل حشره کشی جدایه های به دست آمده روی آفاتی از راسته های بال پولکداران و سخت بالپوشان، *S. exigua* و *Anticarsia gemmatalis*، ارزیابی و ۴۱ سویه Bt، با خاصیت حشره کشی برای *S. exigua* و *A. gemmatalis* معرفی شد (Berón and Salerno 2006).

ویژگی های ۷۰ سویه از باکتری Bt جدا شده از خاک، حشرات مرده و برگ گیاهان، از سه منطقه ای متفاوت آب و هوایی در ایران، با روش های متفاوتی تعیین گردید. از جمله روش های به کار گرفته شده برای توصیف جدایه های Bt بومی ایران می توان به بررسی محتوای ژنی با استفاده از روش های مبتنی بر واکنش زنجیرای پلی مرز با به کارگیری ۲۵ آغازگر اختصاصی و عمومی برای ژن های *cry1*، *cry2*، *cry9* و *vip3Aa* ریخت شناسی کریستال ها، پروفایل پلاسمیدها، الگو باندهای پروتئینی و فعالیت حشره کشی روی لاروهای سن یک *Helicoverpa armigera* اشاره کرد (Seifinejad et al., 2008). سویه هایی از باکتری Bt که ژن *vip3Aa* را داشتند، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده اند. بر اساس مطالعات مولکولی و ریخت شناسی سویه های بومی باکتری Bt، فعالیت حشره کشی ۲۰ سویه در برابر لاروهای سن یک *H. armigera*، آزمون گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که چهار سویه ای Bt، برای لاروهای *H. armigera* زهر آگین تر از *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* بودند، اما این چهار سویه، از نقطه نظر پروفایل پروتئینی و محتوای ژن های *cry*، شباهت هایی به *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* داشتند (Seifinejad et al., 2008).

تنوع ژن های *cry* و *cyt* اختصاصی دوبالان در ۱۲۸ جدایه بومی از باکتری Bt که از نقاط مختلف ایران جمع آوری شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی های ریخت شناسی، پروفایل پروتئینی و محتوای ژنومی جدایه ها مطالعه گردید. تعداد ۳۸ پروفایل ژنی *cry* شناسایی شد و تعدادی از این ژن ها قبلاً منتشر نشده بودند و با توجه به ویژگی های مورفولوژیک، پروفایل پروتئینی و محتوای ژنی به نظر می رسد کاندیدهای مناسبی برای کنترل دوبالان می باشند (Salehi jouzani et al., 2008a).

ویژگی های سویه های جدیدی از باکتری Bt، تحت عنوان M15، از نقطه نظر محتوای ژن های *cry*، همسان سازی ژن های شناسایی شده و تعیین دامنه های میزبانی پروتئین های تولید شده، تعیین گردید. سویه های M15 جداسازی شده از کنه های تارتن دو لکه ای مرده (*Tetranychus urticae*) تولید اجسام کریستالی کروی شکل می کرد که این کریستال ها بر اساس نتایج ژل الکتروفورز، حداقل دو پروتئین اصلی ۸۶ و ۷۹ کیلودالتونی تولید می کنند. بعد از همسان سازی ژن های *cry* بافت شده، بر اساس تشابه در توالی اسیدهای آمینه، به این ژن، نام *cry31Aa2* اطلاق گردید. نکته ای جالب این بود که برخلاف جداسازی اولیه این باکتری از کنه، سویه M15 برای کنه های دو لکه ای بیماری زا نیست و همچنین با اینکه تولید بتا اگزوتوکسین نمی کند، نتایج استفاده از این توکسین روی سلول های پستانداران نشان می دهد که Cry31Aa2 زمانی که با تریپسین شکسته می شود، برای برخی از سلول های سرطانی انسان کشنده است اما هیچ اثر سوئی روی سلول های سالم ندارد (Jung et al., 2007).

برای غربالگری جدایه های Bt به دست آمده از نمونه های خاک در پژوهش Antonino de Souza و همکاران (۲۰۰۹)، فعالیت حشره کشی و آزمون های زیست سنجی، مبنا قرار گرفت. زهرآگینی ۳۰ جدایه از باکتری Bt، در یک غلظت 1×10^9 اسپور بر میلی لیتر، علیه لارو سن یک *S. frugiperda*، مورد بررسی قرار گرفت. در میان جدایه های مورد بررسی، سویه I4A7، بیشترین زهرآگینی را برای لاروهای حشره ای هدف داشتند. مقدار LC50 محاسبه شده برای این سویه برابر با *B. thuringiensis var. israelensis*، و به طور معنی داری بیشتر از *B. thuringiensis var. kurstaki* بوده است.

در پژوهش Baig و همکاران (۲۰۱۰)، ۳۱ جدایه از باکتری Bt، بر اساس شکل کریستال، آزمون های بیوشیمیایی و پروفایل ژن های *cry*، توصیف گردید. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی، حضور و یا عدم حضور ژن های *cry1*، *cry4*، *cry7*، *cry8*، *cry9* و *cry10*، بررسی شد. نتایج بررسی آن ها نشان داد که ژن *cry1*، در بین سویه های مورد بررسی، بیشترین فراوانی را داشته است.

ریخت شناسی کلنی های باکتریایی، ویژگی کریستال ها و پروفایل پروتئینی، معیارهای توصیف هفت سویه Bt در پژوهش Lenina و همکاران (۲۰۱۴)، قرار گرفت. همچنین، این سویه ها از لحاظ محتوای ژنی با تمرکز

روی ژن های *cry* و *ps* مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که در دو سویه، ژن های *ps4* حضور دارد. سپس در بررسی فعالیت پروتئولیتیکی، مشخص شد که این پروتئین Ps4 برای *S. litura* و *H. armigera* سمی نیست.

شکل کریستال ها، محتوای ژنی (*cry1*, *cry2*, *cry9* و *vip3*)، فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی ۱۵۷ جدایه از باکتری Bt جداسازی شده در الجزایر، ارزیابی گردید (Djenane et al., 2017). بر اساس نتایج به دست آمده، اکثر جدایه ها فعالیت ضد قارچی و تعداد کمی فعالیت ضد باکتریایی داشتند. از لحاظ شکل شناسی کریستال ها، تنوع زیادی شامل اشکال؛ کرومی، دوهرمی، نامنظم، مثلثی، مکعبی و تخم مرغی مشاهده گردید. در این پژوهش، ژن *cry2*، بیشترین فراوانی را در بین ژن های مورد بررسی در جدایه های Bt، داشته است.

آزمون های زیست سنجی، اطلاعات جامعی از فعالیت حشره کشی سویه های باکتری Bt و یا توکسین های خالص شده Bt، فراهم می آورند. تعداد روزافزون مقاله های مرتبط با زهرآگینی سویه ها و یا توکسین های Bt، نشان دهنده اهمیت آزمون های زیست سنجی در تعیین ویژگی های باکتری Bt، می باشد. مطالعات زیادی بر بررسی زهرآگینی نسبی توکسین های باکتری Bt، تمرکز کرده اند که البته، تفاوت هایی در انجام آزمون های زیست سنجی به دلیل نوع توکسین مورد استفاده (اجسام کریستالی، پیش توکسین، و یا توکسین فعال شده)، منشاء توکسین و سویه ی مورد استفاده، و هم چنین کلنی حشره مورد بررسی دیده شده است.

پتانسیل حشره کشی هفت توکسین خالص شده ی *Cry*، شامل توکسین های *Cry1Ja*، *Cry1Ab*، *Cry1Fa*، *Cry1Ia7*، *Cry2Aa*، *Cry1Ab* و *Cry9Ca* برای کنترل *Lobesia botrana* مورد آزمون قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، لاروهای *L. botrana* بیشترین حساسیت را نسبت به توکسین *Cry9Ca* داشتند (Ruiz de Escudero et al., 2007).

فعالیت حشره کشی نه پروتئین *Cry* فعال برای آفات بال پولکدار؛ *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac*، *Cry1Ba*، *Cry1Ca*، *Cry1Da*، *Cry1Fa*، *Cry2Aa* و *Cry2Ab*، روی سه جمعیت آزمایشگاهی متفاوت *Spodoptera exigua* آزمون گردید. بر اساس نتایج به دست آمده توکسین های *Cry1Ca*، *Cry1Da* و

Cry1Fa، بیشترین زهرآگینی را علیه لاروهای سن یک *S. exigua*، داشتند (Hernández-Martínez et al., 2009).

حساسیت یک جمعیت اروپایی از *Ostrinia nubilalis*، به یک فرمولاسیون حاوی سویه‌ی مرجع از باکتری Bt، Bt HD-1-S-2005، و توکسین‌های تشکیل دهنده‌ی آن سویه؛ Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac و Cry2Aa، بررسی گردید. دو توکسین Cry1Ab و Cry1Ac، به اندازه‌ی فرمولاسیون سویه‌ی مرجع، زهرآگینی داشتند و لاروهای *O. nubilalis* حساسیت کمتری به توکسین‌های Cry1Aa و Cry2Aa، نشان دادند (Crava et al., 2009). زهرآگینی مخلوطی از اسپور و کریستال سویه‌ی SY49.1 باکتری Bt، روی لاروهای شب‌پره‌ی هندی، *Plodia interpunctella*، آزمون شده است، نتایج حاکی از آن بود که LC_{50} سویه‌ی مورد بررسی، برابر با 2×10^6 اسپور بر گرم بوده است (Yilmaz et al., 2012). فعالیت حشره‌کشی توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ac، Cry1Ca، Vip3Aa، Vip3Af و Vip3Ca (به صورت انفرادی و همچنین مخلوط با هم) علیه لاروهای *Grapholita molesta* ارزیابی شده است. بر اساس نتایج زیست‌سنجی، زهرآگین‌ترین پروتئین‌های مورد بررسی، Vip3Af و Cry1Aa بودند (Scaramal Ricietto et al., 2016).

فعالیت حشره‌کشی کریستال‌های سویه‌ی Bt MPUB9، به تنهایی و مخلوط با پروتئین‌های Vip3Aa، روی لاروهای *S. exigua*، *Cydia pomonella* و *Dendrolimus pini*، بررسی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، کریستال‌های سویه‌ی مورد بررسی بیشترین زهرآگینی را برای *D. pini* داشتند. استفاده از مخلوط کریستال‌های سویه‌ی Bt MPUB9، با توکسین‌های Vip3Aa اثر سینرژیستی داشته و باعث افزایش فعالیت حشره‌کشی سویه‌ی مورد نظر شده است (Baranek et al., 2017).

حساسیت کلنی‌هایی از حشرات مقاوم به توکسین‌های Cry1، Cry2 و فرمولاسیون Dipel؛ شامل گونه‌های *Tricholusia ni*، *P. interpunctella*، *Helicoverpa armigera* و *O. furnacalis*، به پروتئین‌های Vip3Aa و Vip3Ca مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که انتظار می‌رفت، کلنی‌هایی از حشراتی که مقاوم به Cry1A و Cry2Ab بودند، مقاومت تقاطعی نسبت به توکسین‌های Vip3 از خود نشان ندادند.

همچنین توکسین Vip3Ca به شدت برای لاروهای *O. furnacalis* زهرآگین بود، در حالی که توکسین Vip3Aa، اثر بازدارندگی رشد هم روی لاروهای مذکور نداشته است (Gomis-Cebolla et al., 2018).

از جمله روش های مولکولی مورد استفاده برای تعیین ویژگی های جدایه های باکتری Bt، تفاوت جدایه ها در الگوی باندهای پروتئینی و وزن مولکولی پروتئین های توکسین، در الکتروفورز SDS-PAGE می باشد. در این روش، سویه های متفاوت باکتری Bt، با استناد به تعداد و اندازه ی باندهای پروتئینی مشاهده شده در ژل، توصیف، گروه بندی می شوند و فعالیت حشره کشی احتمالی آن ها پیش گویی می گردد. در پژوهش های بی شماری از الکتروفورز SDS-PAGE، در کنار سایر روش ها (بررسی ویژگی های ریخت شناسی کریستال ها، زیست سنجی، تعیین محتوای ژنی) برای تعیین ویژگی های سویه های باکتری Bt استفاده می گردد (Hernández et al., 2005; Rampersad et al., 2005; Seifinejad et al., 2008; Vidal-Quist et al., 2009; Hernández-Fernández et al., 2011).

یکی از روش های معمول برای تعیین محتوای ژنی سویه های جدید از باکتری Bt، ردیابی ژن ها به وسیله ی واکنش های زنجیره ای پلی مرز، می باشد. شناسایی محتوای ژنی با روش های مبتنی بر واکنش های زنجیره ای پلی مرز، روشی سریع و دقیق برای تکثیر قطعه ی خاصی از دی.ان.ای، به منظور بررسی حضور یا عدم حضور ژن هدف، می باشد. شناسایی ژن های توکسین Bt با واکنش زنجیره ای پلی مرز، می تواند فعالیت حشره کشی سویه مورد نظر را پیش گویی کند (Porcar 2003). شناسایی ژن های *cry* باکتری Bt بر اساس واکنش زنجیره ای پلی مرز، برای اولین بار توسط Carozzi و همکاران در سال ۱۹۹۱ انجام گرفت، و این روش را به عنوان ابزاری برای پیش گویی فعالیت و یا پتانسیل حشره کشی سویه های Bt معرفی کردند. با استفاده از روش های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز، سویه های باکتری Bt بر مبنای داشتن ژن های فعال و زهرآگین برای حشراتی از راسته های بال پولک داران، سخت بالپوشان و دوبالان دسته بندی شدند. این غربال گری بر اساس ژن های *cry*، منجر به شناسایی ۲۲ ژن مشخص *cry* در ۱۲۶ جدایه ی باکتری Bt گردید (Ben-Dov et al., 1997). پژوهش های



بی شماری، محتوای ژنی سویه های باکتری Bt، با تمرکز روی ژن های مدنظر، تعیین و پتانسیل حشره کشی سویه های مورد بررسی را تفسیر و پیش گویی کردند (Uribe et al., 2003; Baig et al., 2010; Lenina et al., 2014; Djenane et al., 2017).

یکی دیگر از روش های تعیین ویژگی های سویه های Bt، ارزیابی ترکیب پروتئین های موجود در کریستال های باکتری Bt، می باشد. عموماً محققین، از روش های LC-MS/MS، برای تعیین پروتوکسین های موجود در کریستال، استفاده می کنند. با استفاده از بلوک های ژل الکتروفورز و پروتئومیکس به روش LC-MS/MS، ترکیب پروتئین های موجود در دو سویه ی *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* و *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* تعیین گردید. پژوهش صورت گرفته نشان داد که پیش توکسین های Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry2Aa و سویه ی *kurstaki* و پیش توکسین های Cry4Aa، Cry4Ba، Cry10Aa، Cry11Aa، Cyt1Aa و Cyt2Ba در زیرگونه *israelensis* وجود دارد (Fu et al., 2008).

با تلفیقی از روش های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز و پروتئومیکس، سویه ی 4.0718 از باکتری Bt، از لحاظ محتوای ژنی و ترکیب پروتئین های کریستال، شناسایی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که پنج ژن متفاوت *cry*: *cry1Aa*، *cry1Ac*، *cry2Aa*، *cry2Ab* و *cry1Ia*، در ژنوم و سه پیش توکسین Cry1Aa، Cry2Aa و Cry1Ac، در اجسام کریستالی سویه ی 4.0718 وجود دارد (Sun et al., 2008).

کل محتوای پروتئینی سویه ی 4.0718 Bt، در سه مرحله ی رشدی باکتری؛ رشد رویشی، اوایل اسپورزایی و اواخر اسپورزایی، با روش های پروتئومیکس، MALDI-TOF/TOF MS مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، پروتئین های کریستالی حشره کش شامل Cry1Ac، Cry2Aa، مهارکننده های سیستم ایمنی (InhA)، در سویه ی مورد بررسی، شناسایی گردید. مهارکننده های سیستم ایمنی (InhA)، در اواسط مرحله ی رشد رویشی چرخه ی زندگی باکتری Bt تولید شدند، احتمال می رود این فاکتورها به زنده مانگی باکتری درون بدن میزبان کمک می کند. در ابتدای مرحله ی اسپورزایی، پروتئین های حشره کش شناسایی شدند (Li et al., 2012).

در حدود ۸۳۰ پروتئین و ۱۷۰۰ پپتید طی مطالعات دو بعدی LC-MS/MS کل محتوای پروتئینی سویه ی Bt 4.0718، در اواخر مرحله ی اسپورزای چرخه ی زندگی باکتری شناسایی گردید. نتایج پروتئومیکس نشان داد که در مجموع تعداد ۱۵ توکسین در این سویه از باکتری شناسایی شده که در بین آن ها هفت توکسین جدید معرفی گشته است (Yang et al., 2015).

امروزه، بیش از ۵۰۰ رده ی سلولی حشرات مشتق شده از بافت های گوناگون حشرات متعلق به راسته های مختلف، تهیه شده است. رده های سلولی حشرات، به عنوان ابزار تحقیقاتی در مطالعات ویروس شناسی، مکانیسم های سیگنالی در سیستم ایمنی، بیان ژن و در برنامه های غربالگری کشف توکسین های حشره کش مورد استفاده قرار می گیرد (Smagghe et al., 2009). در استفاده از رده های سلولی حشرات، مشکلات پرورش کلنی حشره مورد نظر، تهیه ی رژیم غذایی، پرورش گیاه، انسکتاریوم برای نگهداری کلنی، زمان و هزینه ی زیاد برای نگهداری حشرات، مسائل قرنطینه ای، در دسترس نبودن تمامی گونه های آفت مورد نیاز، وجود ندارد. در نتیجه، امروزه بسیاری از محققین به استفاده از رده های سلولی روی آورده اند. به ویژه در مورد مطالعات غربالگری که اثر تعداد زیادی از توکسین و یا سویه ی باکتریایی، روی تعداد زیادی از حشرات بررسی می گیرد تا دامنه ی فعالیت توکسین و یا سویه ی مورد بررسی تعیین گردد. همچنین، رده های سلولی از نقطه نظر بررسی نحوه ی اثر توکسین های باکتری Bt اهمیت پیدا کرده اند (Portugal et al., 2014; Chen et al., 2015; Willcoxon et al., 2016; Portugal et al., 2017).

فعالیت سلول کشی تعداد ۱۷۴۴ سویه از باکتری Bt در برابر سلول های خونی سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. از این میان، تعداد ۱۶۸۴ سویه Bt هیچ فعالیت همولیتیکی نداشتند و ۴۲ سویه سلول های خونی سرطانی را از بین بردند. پاراسپورین های استخراج شده از این سویه ها، خاصیت حشره کشی در برابر بال پولکداران و دوبالان نداشتند (Mizuki et al., 1999).

اثر دلتا-اندوتوکسین باکتری Bt روی هشت رده ی سلولی حشرات مورد بررسی قرار گرفت. رده های سلولی که از *Manduca sexta* و *Choristoneura fumiferana* گرفته بودند، بیشترین حساسیت را در برابر دلتا اندوتوکسین از خود نشان دادند. همچنین *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* بیشترین دامنه ی

میزبانی را در بررسی های آزمایشگاهی داشته است. بر اساس نتایج به دست آمده، بررسی اثر توکسین های Bt روی رده ی سلولی حشرات برای بررسی حضور یک پروتئین خاص و مطالعه ی نحوه ی اثر Bt روشی بسیار مناسب و سریع می باشد اما پاسخ سلول های حشرات به توکسین های Bt در شرایط آزمایشگاهی اغلب با نتایج حاصل از زیست سنجی روی خود موجود متفاوت است (Gringorten et al., 1999). بنابراین فرضیه مورد بررسی در این فصل از رساله، به این ترتیب بود که احتمال جداسازی و شناسایی سویه های بومی از باکتری Bt از مناطق بکر در ایران (بدون سابقه ی پاشش محصولات Bt) با فعالیت حشره کشی، وجود دارد.

۲-۲- مواد و روش ها

۲-۲-۱- سویه های باکتری های مورد استفاده

در این پژوهش در مجموع، تعداد ۱۳۰ سویه ی ایرانی از باکتری Bt مورد استفاده قرار گرفت. از بین سویه های مورد بررسی، ۸۸ سویه ی باکتری Bt، از کلکسیون بیمارگرهای حشرات موجود در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آفات در گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران انتخاب و ۴۲ سویه در طی نمونه برداری برای این رساله، تهیه شد. هم چنین در این رساله، از دو سویه ی مشخص HD-1-S-2005 و HD-2، تهیه شده توسط گروه بیوتکنولوژی و زیست پزشکی دانشگاه والنسیا^۱، اسپانیا، به عنوان مرجع استفاده گردید. توالی، تعداد و نوع ژن های حشره کش این دو سویه مرجع مشخص و ثبت شده است. به علاوه از سویه های متفاوت (DH5 α و BL21) باکتری *Escherichia coli* به عنوان میزبان باکتریایی، برای همسان سازی و بیان ژن های *cry* باکتری Bt بهره گرفته شد.

۲-۲-۲- حشرات مورد استفاده

در این رساله از لاروهای هشت گونه ی متفاوت از آفات بال پولکدار و یک گونه از سخت بالپوشان برای انجام آزمایش های زیست سنجی و آزمون های اتصال^۲ توکسین باکتری Bt به گیرنده های روده ی میانی استفاده شد. از میان آفات مورد استفاده، چهار گونه *Mamestra brassicae*، *S. littoralis*، *Spodoptera exigua* و

^۱ ERI Of Biotechnology And Biomedicine, University Of Valencia

^۲ Binding Assay

Helicoverpa armigera متعلق به خانواده Noctuidae می باشند. دو گونه از آفات بال پولک دار انتخابی؛ *Grapholita molesta* و *Lobesia botrana* از خانواده ی Tortricidae هستند. لاروهای دو گونه ی *Plodia interpunctella* (متعلق به خانواده Pyralidae) و *Ostrinia nubilalis* (از خانواده Crambidae) نیز در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. هم چنین سوسک برگ خوار سیب زمینی، *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) به عنوان میزبان سخت بالپوش برای توکسین های باکتری Bt انتخاب شده بود. تمامی حشرات مورد استفاده در این پژوهش روی رژیم غذایی مصنوعی (McGaughey and Beeman 1988; Lozzia and Manachini 2003; Ruiz de Escudero *et al.*, 2007; Hernández-Martinez *et al.*, 2008; Bel *et al.*, 2011; Gomis-Cebolla *et al.*, 2017) در شرایط دمایی 25 ± 3 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و شرایط نوری ۱۶:۸ ساعت روشنایی: تاریکی پرورش داده شدند.

۲-۲-۳- رده های سلولی^۱ مورد استفاده

در این پژوهش از چهار رده ی سلولی از آفات بال پولک دار خانواده ی Noctuidea برای بررسی اثر توکسین های باکتری Bt استفاده شد (جدول ۱-۲).

جدول ۲-۱- اسامی رده های سلولی مورد استفاده.

Cell line	Insect	Derived tissue	Reference
BTI-Tn-5B1-4 (Hi5)	<i>Trichoplusia ni</i>	Ovarian cells	Granados <i>et al.</i> , 1994
RP-HzGUT-AW1	<i>Helicoverpa zea</i>	Gut	Goodman <i>et al.</i> , 2004
UCR-SE	<i>S. exigua</i>	Larvae	Gelernter and Federici 1986
Sf21	<i>S. frugiperda</i>	Ovary	Vaughn <i>et al.</i> , 1977

رده های سلولی مورد مطالعه، در انکوباتور با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. رده های سلولی HzGUT و UCR-SE در محیط کشت سلولی Excell (Sigma-Aldrich) غنی شده با سرم جنین

¹ Cell Line

گاوی^۱ (FBS) پنج درصد کشت داده شدند. برای نگهداری رده‌های سلولی Hi5 و Sf21 به ترتیب از محیط‌های کشت سلولی TNM-FH (Sigma-Aldrich) با پنج درصد FBS و Grace's (GibcoTN) با ده درصد FBS، استفاده گردید.

۲-۲-۴- نمونه‌برداری از خاک و میزبان

نمونه‌برداری از لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی و هم‌چنین خاک جنگل، باغ درختان میوه، زمین‌های کشاورزی و مناطقی با پوشش گیاهی طبیعی در استان مازندران و البرز انجام گرفت. برای نمونه‌برداری از خاک، محل‌های دور از تابش مستقیم آفتاب در عمق ۵ تا ۱۵ سانتی‌متری از سطح خاک انتخاب و نمونه‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی با درج میزبان گیاهی، محل و تاریخ نمونه‌برداری، به آزمایشگاه منتقل شدند. اجساد لاروهای مختلف که احتمال مرگ آن‌ها در اثر آلودگی باکتریایی وجود داشت، جمع‌آوری و درون لوله‌های شیشه‌ای به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در مجموع تعداد ۲۴ نمونه خاک و لارو آلوده جمع‌آوری و باکتری Bt از آن‌ها جداسازی شد.

۲-۲-۵- جداسازی باکتری Bt

برای جداسازی باکتری Bt از نمونه‌های خاک، روش انتخابی استات سدیم (Travers, ۱۹۸۷) با غلظت ۰/۳۵ مولار مورد استفاده قرار گرفت. اساس این روش به این ترتیب است که ابتدا جوانه‌زنی اسپورهای باکتری Bt به طور انتخابی توسط استات سدیم ۰/۳۵ مولار مه‌ار می‌شود. در حالی که اسپور سایر باکتری‌های تشکیل دهنده‌ی اسپور قادر به جوانه‌زنی هستند. سپس با اعمال تیمار حرارتی باکتری‌هایی که اسپور آن‌ها جوانه زده است و هم‌چنین باکتری‌هایی که اساساً توانایی تولید اسپور ندارند، حذف می‌شوند. در نتیجه پس از کشت مایع حرارت دیده، در صورت وجود باکتری Bt در نمونه‌ی جمع‌آوری شده، کلنی‌های باکتری Bt قابل رؤیت هستند. روش انجام کار به این ترتیب بود که ابتدا نمونه‌ها خوب بهم زده و سپس الک شدند، سپس یک گرم از خاک هر نمونه توزین و به لوله‌ی آزمایش استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر استات سدیم ۰/۳۵ مولار افزوده شد. نمونه‌ها به مدت چهار

¹ Fetal Bovine Serum (FBS)

ساعت در استات سدیم انکوبه و هر ده دقیقه، لوله‌ها به خوبی تکان داده شدند. سپس، لوله‌های آزمایش حاوی استات سدیم و خاک به حمام آب گرم منتقل و به مدت هفت دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. ده میکرولیتر از محلول خارج شده از حمام آب گرم که احتمالاً حاوی اسپور باکتری Bt می‌باشد، در ظروف پتری حاوی محیط غذایی آگار^۱ (NA)، حاوی پنج گرم پپتون، سه گرم عصاره گوشت و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر کشت داده شد. ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. برای جداسازی باکتری Bt از میزبان، ابتدا لاروهای مرده و مشکوک به آلودگی در هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد، الکل ۷۰ درصد و آب مقطر استریل ضد عفونی سطحی شدند. سپس به کمک یک اسکالپل (تیغ جراحی) استریل بدن لارو شکاف داده شد و محتویات بدن لارو در محیط غذایی آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری ظروف پتری در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در صورت آلوده بودن لاروها به باکتری Bt، کلنی‌های سفید تا شیری رنگی در سطح محیط کشت ظاهر شدند.

پس از جداسازی باکتری از خاک و میزبان، کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط غذایی آگار که از لحاظ ویژگی‌های ظاهری و ریخت‌شناسی، از نقطه نظر رنگ کلنی، منظره سطح کلنی، نحوه‌ی رشد، حاشیه و سطح کلنی متفاوت بودند، جدا و در محیط کشت جدیدی تک کلنی شدند. سپس کلنی‌های باکتریایی که مشابه باکتری Bt بودند، ابتدا با تهیه‌ی اسلاید میکروسکوپی، حضور اسپور و کریستال با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست مدل Zeiss Axiophot 20 (Germany) تأیید و سپس آزمون رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام گرفت. از تمام کلنی‌های مربوط به باکتری Bt، بعد از نامگذاری آن‌ها با توجه به نام محل جمع‌آوری و میزبان گیاهی، زیرکشت تهیه شد. به منظور انجام مطالعات تکمیلی، جدایه‌های به دست آمده در دمای ۲۰- و ۸۰- درجه سلسیوس برای ذخیره‌ی به ترتیب کوتاه و طولانی مدت نگهداری شدند.

¹ Nutrient Agar

۲-۲-۶- نگهداری ذخایر کشت باکتریایی

برای نگهداری کوتاه و طولانی مدت جدایه‌های باکتری Bt، از روش منجمد کردن به همراه گلیسرول، به‌عنوان یک محافظت‌کننده از سرما استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا جدایه‌های باکتری Bt در ظروف پتری حاوی محیط کشت CCY (Stewart et al., 1981) کشت و به مدت یک شب در دمای ۲۹ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. ده میلی‌لیتر از محیط مایع CCY با یک تک کلنی تازه از باکتری Bt تلقیح شد و به مدت دو روز، در دمای ۲۹ درجه سلسیوس و با ۲۰۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور نگهداری گردید. سپس حضور اسپور و کریستال باکتری Bt با مشاهده میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده اسپور و کریستال در ۹۰ درصد سلول‌های باکتری، تیمار حرارتی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس انجام گرفت. بعد از خنک شدن محیط کشت حاوی باکتری، ذخیره‌ی گلیسرولی ۵۰ و ۲۰ درصد برای نگهداری جدایه‌های باکتری Bt به ترتیب در دماهای ۲۰- و ۸۰- درجه سلسیوس تهیه شد. برای ذخیره در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری، به ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول اتوکلاو شده موجود در کرایوویال^۱ استریل اضافه گردید. به همین ترتیب برای ذخیره در دمای ۸۰- درجه سلسیوس، ۸۵۰ میکرولیتر از محیط کشت به کرایوویال استریل حاوی ۱۵۰ میکرولیتر گلیسرول اتوکلاو شده افزوده شد. محتویات ویال‌ها به مدت ۱۰ ثانیه، به آرامی با ورتکس^۲ کردن مخلوط شدند و سپس به مدت چند دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفتند. در نهایت سویه‌های باکتریایی محافظت شده، در جعبه‌های مخصوص نگهداری کرایوویال به فریزرهای ۲۰- و ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

۲-۲-۷- تعیین ویژگی ریخت‌شناختی باکتری

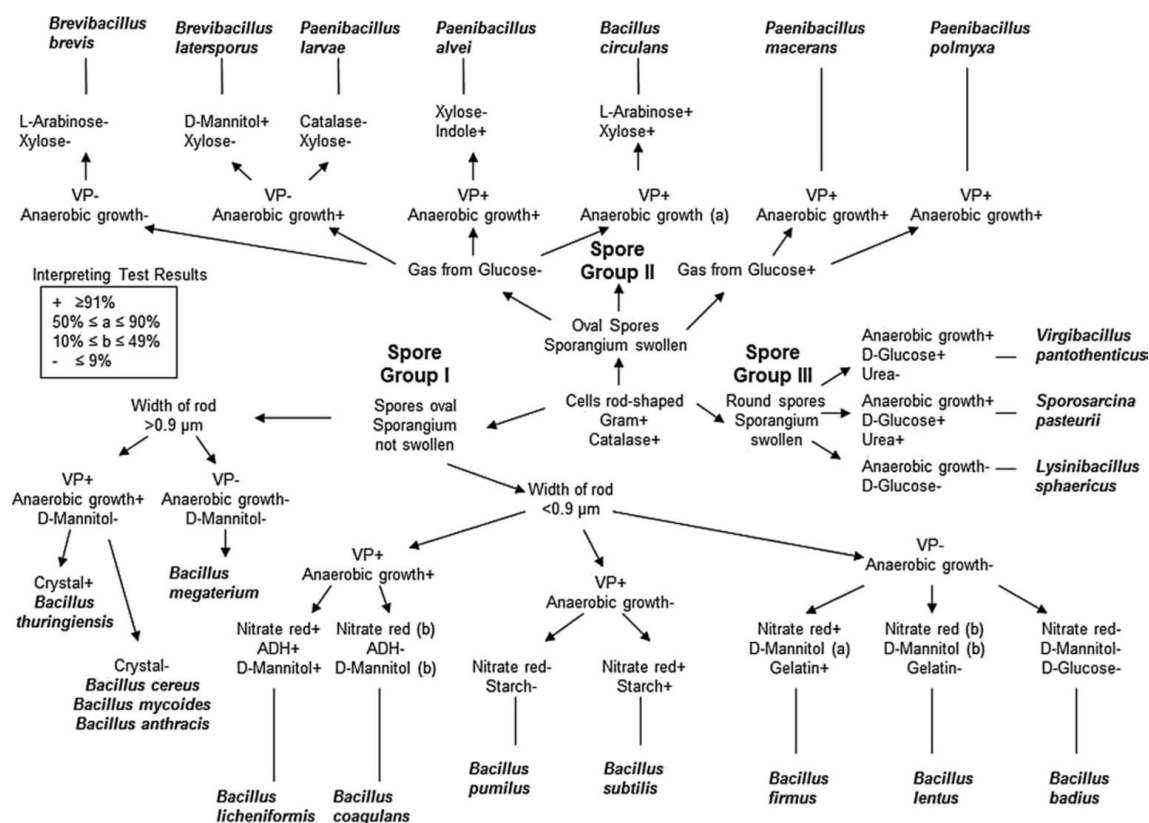
بعد از تشخیص سلول‌های میله‌ای شکل از مرحله رشد رویشی باکتری، با استناد به کلید شناسایی ارائه شده در شکل ۱-۲، آزمون رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام گرفت. این کلید شناسایی، با توجه به حداقل ویژگی‌های فنوتیپی، در تشخیص ۲۲ گونه مهم از جنس *Bacillus* مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thiery and

^۱ Cryovial

^۲ Vortex

(Frachon, 1997). سپس با توجه به ویژگی های ریخت شناسی مرحله رشد زایشی باکتری و مشاهده اسپور و

کریستال، تشخیص باکتری Bt محرز شد.



شکل ۲-۱- کلید شناسایی گروه های اصلی باکتری های باسیلی شکل (Thiery and Frachon, 1997).

۲-۲-۸- رنگ آمیزی گرم

بعد از مشاهدات میکروسکوپی ریخت شناسی باکتری و تشخیص باسیلی فرم بودن باکتری ها، برای تشخیص گرم مثبت یا گرم منفی بودن جدایه های به دست آمده، آزمون رنگ آمیزی گرم انجام گرفت. به این ترتیب که جدایه های به دست آمده روی محیط غذایی آگار، برای داشتن یک کلنی به صورت خطی کشت داده شدند. ظروف پتری کشت داده شده به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس در زمانی که باکتری در مرحله رشد رویشی می باشد، در شرایط استریل یک کلنی از باکتری را برداشته و با یک قطره آب مقطر استریل روی یک لام تمیز مخلوط شد. پس از اینکه گستره ی باکتریایی مخلوط شده با آب در نزدیکی

شعله خشک گردید، گستره‌ی تثبیت شده به مدت یک دقیقه ابتدا در محلول کریستال بنفش^۱ (یک گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بعد یک دقیقه در محلول ید^۲ (یک گرم در ۲۰ میلی‌لیتر) نگه داشته شد. سپس عمل رنگ‌بری با الکل ۹۰ درصد انجام گرفت. لام با زاویه‌ی ۴۵ درجه نگه داشته و الکل قطره قطره روی گستره ریخته شد تا زمانی که آخرین قطره‌ی رنگی از گستره خارج گردد، سپس بلافاصله با آب مقطر شست و شو داده شد. در مرحله‌ی بعد گستره‌ی باکتری ۱۵ ثانیه در محلول رنگی فوشین^۳ (۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) قرار گرفت و بعد سریعاً با آب مقطر شست و شو داده شد. بعد از خشک شدن لام، یک قطره روغن ایمرسیون مستقیماً روی لام ریخته و با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده گردید. برای مقایسه و به عنوان شاهد از باکتری گرم منفی *Pseudomonas sp.* استفاده گردید. پس از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های گرم مثبت به رنگ بنفش تیره در می‌آیند در حالی که باکتری‌های گرم منفی صورتی رنگ می‌شوند.

۲-۹- تست کاتالاز

باکتری‌های هوازی که برای متابولیسم به اکسیژن نیاز دارند، با استفاده از آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و اکسیژن تبدیل و از اکسیژن تولیدی استفاده می‌کنند. برای تشخیص وجود کاتالاز در جدایه‌های باکتریایی به دست آمده، پراکسید هیدروژن رقیق شده به گستره‌ی باکتری افزوده شد، ظهور سریع حباب‌های اکسژن، مؤید حضور آنزیم کاتالاز در جدایه مورد بررسی بود. روش انجام این تست به این ترتیب بود که ابتدا کشت تازه‌ی ۱۶ تا ۱۸ ساعته از جدایه‌های باکتریایی در محیط غذایی آگار تهیه شد. حجم ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ تا ۶ درصد به یک میکروتیوب تمیز منتقل گردید. به وسیله‌ی یک لوپ استریل، یک تک کلونی از باکتری برداشته و به دیواره میکروتیوب در مجاورت پراکسید هیدروژن کشیده شد. با کج کردن میکروتیوب، پراکسید هیدروژن رقیق شده به گستره‌ی باکتریایی می‌رسد و در صورت وجود آنزیم کاتالاز، حباب‌های اکسیژن ظاهر می‌گردد.

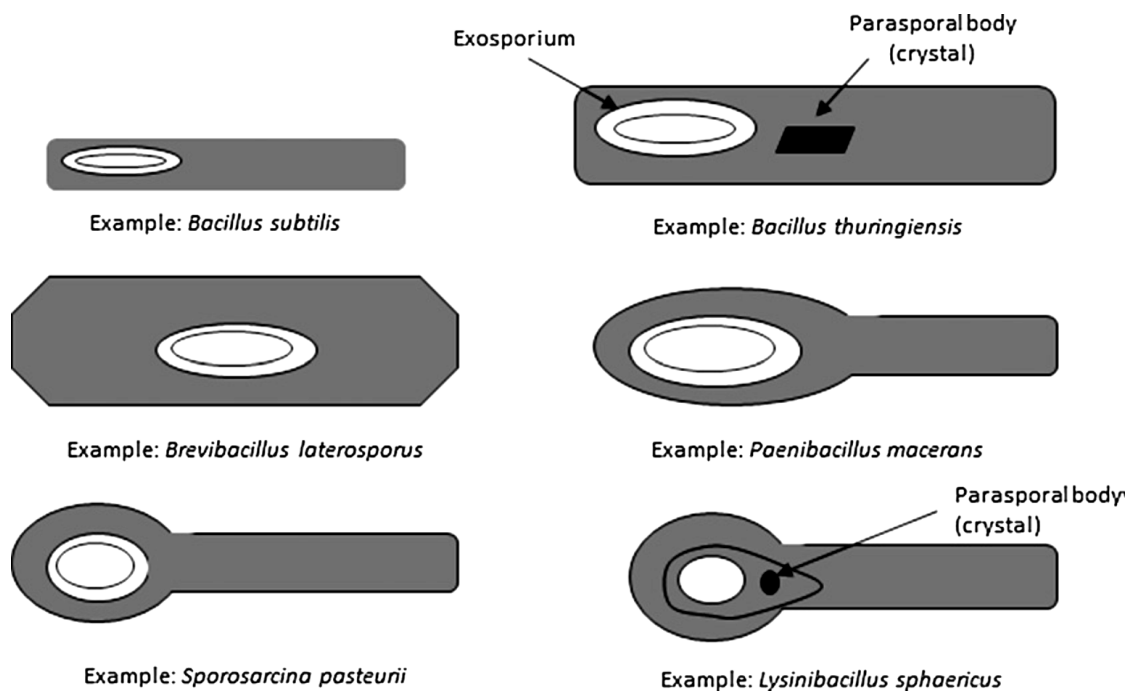
¹ Crystal Violet

² Iodine

³ Fuchsin

۲-۲-۱- مشاهده اسپور و تشخیص گروه *Bacillus*

جدایه‌های مورد مطالعه، از نظر شکل اسپور و اسپورانژیوم طبق کلید شناسایی Thiery and Frachon (۱۹۹۷) مورد بررسی قرار گرفتند. در این کلید، گونه‌های مربوط به جنس *Bacillus* بر اساس مرفولوژی اسپور و اسپورانژیوم به سه گروه تقسیم می‌شوند (شکل ۲). گروه اول (I) اندوسپورهای انتهایی بیضوی شکلی تولید می‌کنند که باعث تورم سلول میله‌ای شکل باکتری نمی‌شود که خود به دو دسته تقسیم می‌شود: در دسته اول عرض سلول بیشتر از $0/9$ میکرومتر مثل *Bt* و در دسته دوم عرض سلول کمتر از $0/9$ میکرومتر، مثل *B. subtilis* است. گونه‌های گروه دوم، اندوسپورهای بیضوی شکلی تولید می‌کنند که باعث تورم اسپورانژیوم می‌شود، مانند جنس‌های *Brevibacillus* و *Paenibacillus*. گروه سوم اسپورهای کروی شکل با اسپورانژیوم متورم دارند، مانند *Lysinibacillus* (Thiery and Frachon, 1997).



شکل ۲-۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های جنس *Bacillus* (Thiery and Frachon, 1997).

۲-۱۱- غربالگری جدایه های باکتری Bt بر اساس زهرآگینی روی لاروهای شب پرهی هندی

غربالگری اولیه ی ۱۳۰ جدایه ایرانی از باکتری Bt، بر اساس زهرآگینی روی لاروهای سن دوم شب پرهی هندی، *P. interpunctella* انجام گرفت. برای تهیه ی سوسپانسیون باکتری، جدایه های Bt روی محیط غذایی آگار کشت و به مدت چهار روز در دمای ۲۹ درجه سلسیوس در انکوباتور نگه داشته شدند. بعد از چهار روز، ابتدا با انجام مشاهدات میکروسکوپی، حضور اسپور و کریستال و از بین رفتن دیواره ی ۹۰ درصد از سلول های باکتری (لیز شدن سلول ها^۱)، تأیید گشت. سپس باکتری های رشد کرده روی محیط کشت، زیر هود تحت شرایط استریل، به وسیله یک لوپ استریل جمع آوری و به حجم مناسبی از آب مقطر استریل اضافه گردید. بعد از تهیه سری رقت، سوسپانسیون باکتریایی به کمک لام هموسیتومتر یا لام گلبول شمار با شمارش تعداد اسپورها تعیین غلظت شد. این روش تعیین غلظت، تخمینی از تعداد اسپورهای باکتری Bt در هر میلی لیتر از سوسپانسیون می باشد. هم چنین با قرار دادن میکروسکوپ در وضعیت فازکنتراست، در بزرگنمایی ۱۰۰۰، با استفاده از روغن ایمرسیون تعداد کریستال ها نیز با لام گلبول شمار تخمین زده شد. برای مشخص کردن غلظتی مناسب از باکتری Bt برای انجام زیست سنجی تنها با یک غلظت^۲، پنج غلظت از سویه ی AzLp روی لاروهای سن دوم *P. interpunctella* آزمون شد. بر مبنای LC₅₀ تخمین زده شده برای سویه AzLp، تک غلظت مورد نظر برای سایر سویه ها تعیین شد. آزمون زیست سنجی به روش ترکیب سوسپانسیون Bt با غذای لارو^۳ انجام گرفت. به این ترتیب که پنج غلظت ۱۰^۴، ۱۰^۵، ۱۰^۶، ۱۰^۷ و ۱۰^۸ اسپور بر میلی لیتر از باکتری AzLp تهیه و دو میلی لیتر از هر غلظت با دو گرم از رژیم غذایی مصنوعی شب پرهی هندی، شامل سبوس گندم، عسل، مخمر و گلیسرول (McGaughey and Beeman 1988) مخلوط شد. مخلوط حاصله در دمای اتاق خشک و سپس به لاروهای سن دوم *P. interpunctella* خورنده شد. بر اساس LC₅₀ محاسبه شده برای سویه AzLp، ۱۳۰ جدایه ی ایرانی از باکتری Bt بر اساس توانایی آن ها در بیماری زایی روی لاروهای شب پرهی هندی در یک غلظت ۱۰^۸ اسپور بر گرم ماده ی غذایی غربالگری شدند. در مورد شاهد، رژیم غذایی لارو با دو میلی لیتر از آب مقطر استریل مخلوط شد. این آزمون در سه تکرار انجام گرفت و در هر تکرار از ۲۰ عدد لارو سن دوم شب پرهی هندی استفاده گشت. بعد از

¹ Cell Lysis

² Single-Dose Assay

³ Food Incorporation

گذشت ۷۲ ساعت از تغذیه‌ی لاروها از غذای تیمار شده با سوسپانسیون Bt، تعداد لاروهای مرده ثبت و درصد مرگ محاسبه گردید.

بر اساس نتایج غربال‌گری اولیه سویه‌های باکتری Bt بر مبنای زهرآگینی آن‌ها روی لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی هندی، ۱۳۰ سویه باکتری Bt، در سه گروه از لحاظ زهرآگینی دسته‌بندی شدند؛ ۱. گروه با زهرآگینی زیاد: سویه‌های با توانایی بیش از ۶۷ درصد مرگ روی لاروهای *P. interpunctella* ۲. گروه با زهرآگینی متوسط: ایجاد مرگ بین ۳۴ تا ۶۶ درصد مرگ، و ۳. گروه با زهرآگینی کم: سویه‌های با توان کمتر از ۳۳ درصد مرگ. هفت سویه‌ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2، IEp، RM و KhF از هر سه گروه انتخاب و به طور جامع و کامل، با به کارگیری روش‌های متعدد، شناسایی شدند. سایر مطالعات این رساله روی این هفت سویه صورت گرفت. در بین این هفت سویه، پنج سویه‌ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEp متعلق به گروه با زهرآگینی زیاد می‌باشد و به منظور مقایسه‌ی ویژگی‌های این پنج سویه، با سویه‌هایی که زهرآگینی کمتری دارند، سویه‌ی KhF از گروه با زهرآگینی متوسط و سویه‌ی RM از گروه با زهرآگینی کم انتخاب گردید.

۲-۲-۱۲- مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی جدایه‌های باکتری Bt

در اولین قدم از تعیین ویژگی هفت سویه باکتری Bt، تعداد و وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در کریستال‌های این هفت سویه مشخص و با هم مقایسه شدند. روش کار به طور خلاصه به این ترتیب بود که بعد از کشت باکتری Bt، ابتدا اسپور و کریستال از مابقی بخش‌های سلول باکتری (آشغال‌های سلولی^۱) و محیط کشت جدا و سپس بعد از چندین مرحله شست‌وشو، کریستال‌ها جدا شدند. سپس کریستال‌های به دست آمده، در بافر انحلال در دمای محیط، حل و پیش‌توکسین حاصل شد. بخشی از پیش‌توکسین به دست آمده، توسط آنزیم تریپسین فعال گردید. در نهایت پروفایل پروتئینی پیش‌توکسین‌ها و توکسین‌های فعال شده‌ی سویه‌های باکتری Bt روی ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE^۲) مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ Cell Debris

^۲ Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

انحلال کریستال‌های پروتئینی سویه‌های باکتری Bt بر اساس پروتکل ارائه شده توسط Estela و همکاران (۲۰۰۴) انجام گرفت. به این ترتیب که سویه‌های باکتری Bt روی محیط کشت آگاردار CCY کشت داده و به مدت دو روز در دمای ۲۹ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس ۵ الی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط مایع CCY، به‌عنوان پیش‌کشت، با یک کلنی از باکتری رشد کرده روی محیط جامد CCY، تلقیح گشت. پیش‌کشت تهیه شده، به مدت دو روز و یا بیشتر در شیکر انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰ تا ۲۰۰ دور در دقیقه^۱ نگه داشته شد. بعد از سپری شدن دو روز، با تهیه اسلاید میکروسکوپی، حضور اسپور و کریستال مورد بررسی قرار گرفت. در صورت وجود اسپور و کریستال، تیمار حرارتی به مدت بیست دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس اعمال گردید (در صورت عدم رؤیت اسپور و کریستال، پیش‌کشت برای مدت زمان بیشتری انکوبه می‌شود). دلیل اعمال تیمار حرارتی، جلوگیری از ایجاد آلودگی و ایجاد هم‌زمانی^۲ رشدی در سلول‌های باکتری است. زیرا در این دما فرم رویشی از بین می‌رود و تنها فرم زایشی باقی می‌ماند، در نتیجه در مراحل رشدی باکتری هماهنگی ایجاد می‌گردد. سپس کشت نهایی با تلقیح ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط مایع CCY، با پنج میلی‌لیتر از پیش‌کشتی که تیمار حرارتی در آن اعمال شده است، تهیه گردید. کشت نهایی به مدت دو روز، در دمای ۲۹ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰ دور در دقیقه نگه داشته شد تا ۹۰ درصد سلول‌های باکتری از بین بروند. اسپور و کریستال باکتری Bt با سانتریفیوژ (Beckman Coulter Centrifuge, AvantiTM J-20 XPI) به مدت ۱۲ دقیقه با دور $6000 \times g$ ، در دمای چهار درجه سلسیوس، از محیط کشت و مابقی بقایای سلولی جدا گشت. ته‌نشین به دست آمده دو مرتبه با NaCl یک مولار و EDTA^۳ ده میلی‌مولار شست‌وشو داده شد. تمامی این مراحل روی یخ انجام گرفت و ما بین هر مرحله شست‌وشو، مخلوط حاصل به مدت ۱۲ دقیقه با دور $17000 \times g$ ، دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. در آخرین مرحله شست‌وشو، به ته‌نشین KCl ده میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با دور $24000 \times g$ ، در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گشت. در انتهای این مرحله، کریستال‌های باکتری Bt تقریباً از اسپورها جدا شدند و در مرحله‌ی بعد باید کریستال‌ها را در بافر انحلال حل کرد. در نتیجه، بافر انحلال؛ بافر کربنات ۵۰

¹ Round Per Minute (rpm)

² Synchronization

³ Ethylenediaminetetraacetic Acid

میلی‌مولار (Na₂CO₃) و DTT¹ ده میلی‌مولار، با pH ۱۰/۵ به ته‌نشین اضافه و به خوبی با ته‌نشین مخلوط گشت. مخلوط حاصل به دو ساعت در دمای محیط با دور ۶۰ دور در دقیقه انکوبه شد. بعد از سانتریفیوژ در دور ۲۴۰۰۰ ×g، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس، پروتئین محلول موجود در رونشین، جمع‌آوری و به یک لوله فالكون تمیز منتقل گردید. پروتئین محلول به دست آمده از انحلال کریستال، از فیلتر ۰/۲ میکرومتری (GE Healthcare WhatmanTM, United Kingdom) عبور داده شد. غلظت پروتئین محلول که همان پیش‌توکسین باکتری Bt می‌باشد، به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد. فعال کردن پیش‌توکسین‌های باکتری Bt، با افزودن آنزیم تریپسین (Trypsin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich) به نسبت وزنی/وزنی (w/w) ده درصد و انکوبه کردن پیش‌توکسین در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت، انجام گرفت. سپس پروفایل پروتئینی پیش‌توکسین و توکسین سویه‌های باکتری Bt با ژل SDS-PAGE مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

۲-۲-۱۳- تعیین محتوای پروتئینی کریستال‌های باکتری Bt به روش LC-MS/MS

در قسمت پیشین با آنالیز SDS-PAGE، تعداد و وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در کریستال‌های باکتری Bt مشخص گردید. اما الگوی پروتئینی به دست آمده توسط SDS-PAGE، به تنهایی کافی نیست، زیرا این احتمال وجود دارد که چندین پروتئین، وزن مولکولی یکسانی داشته باشند. هم‌چنین فراوانی نسبی هر پروتئین در اجسام کریستالی باکتری Bt نقش مهمی در پیشگویی پتانسیل حشره‌کشی آن سویه ایفا می‌کند. در نتیجه، تجزیه و تحلیل پروتئومیکس به روش LC/MS-MS²، روشی مناسب برای شناسایی محتوا و ترکیب پروتئین‌های موجود در اجسام کریستالی سویه‌های باکتری Bt می‌باشد. مطالعات پروتئومیکس در بخش Servei Central de Suport a la Investigacio Experimental (SCSIE) دانشگاه والنسیا انجام گرفت. کریستال‌های پروتئینی انحلال یافته از سویه‌های باکتری Bt که به صورت مخلوط پروتئینی بودند با آنزیم تریپسین (Promega) به طور کامل هضم و تبدیل به مخلوط پپتیدی شدند. به این ترتیب که مخلوط پروتئینی به نسبت ۱:۴ با NH₄HCO₃ ۵۰ میلی‌مولار رقیق گشت و بعد از گذراندن چندین مرحله انکوباسیون در DTT ۲/۵ میلی‌مولار،

¹ Dithiothreitol

² Liquid Chromatography And Tandem Mass Spectrometry

درجه ۵۰ میلی‌مولار و ۱۱ میلی‌مولار، به ترتیب به مدت ۲۰، ۳۰ و ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، با آنزیم تریپسین به نسبت یک به ده (w/w) افزوده و به مدت یک شب (۱۲ تا ۱۶ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تیمار شد. با اضافه کردن هفت میکرولیتر تری‌فلئورواستیک اسید (TFA)^۱، هضم پروتئینی توسط تریپسین، متوقف گردید. تمامی نمونه‌ها تحت خلأ تغلیظ شدند. در نتیجه، نمونه‌ها برای بارگذاری در ستون LC Column, 3 μ C18-CL, 75umx12cm, Nikkyo آماده شدند. شستن پپتیدها از ستون با شیب خطی ۴۰ تا ۵ درصد، به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت. پپتیدها با دستگاه طیف‌سنج جرمی (5600 nanoESI qTOF TripleTOF, ABSCIEX) تجزیه و تحلیل شدند. اطلاعات دستگاه از طریق آلوگوریتیم PARAGON به نرم‌افزار Protein Pilot v 4.5 (ABSciex) فرستاده شد. این نرم‌افزار از پایگاه اطلاعاتی NCBI^۲ برای شناسایی پپتیدهای به دست آمده کمک می‌گیرد و پروتئین‌های شناسایی شده را بر اساس طیف جرمی/جرمی آن‌ها دسته‌بندی می‌کند. به این مفهوم که پروتئین‌هایی که طیف جرمی/جرمی یکسانی دارند، بدون توجه به توالی پپتیدهایی که به آن‌ها نسبت می‌دهند، در یک گروه جای می‌گیرند. پروتئین‌های شناسایی شده از طریق LC-MS/MS، با درصد اطمینان حداقل ۹۵ درصد، معنی‌دار در نظر گرفته شدند و به آن‌ها نمره‌ای معادل ۱/۳ داده شد. ارزش پروتئینی^۳ یا نمره‌ی پروتئینی از طریق فرمول زیر محاسبه شد. درصد اطمینان مختلف و ارزش‌های پروتئین متناظر با آن‌ها در جدول ۲-۲، آمده است.

$$\text{ProtScore} = -\log \left(1 - \frac{\text{Percent confidence}}{100} \right)$$

جدول ۲-۲ - درصد اطمینان و ارزش‌های پروتئینی متناظر با آن.

Protein Score	Confidence Percentage
2	99%
1.3	95%
1	90%
0.47	66%

¹ Trifluoroacetic Acid

² National Center For Biotechnology Information

³ Protscore

در نتیجه، پروتئين‌هایی با درصد اطمینان حداقل ۹۵، انتخاب و سایر پروتئين‌های زائد و اضافی شناسایی شده، از لیست حذف گردید. در بین پروتئين‌های باقی مانده در لیست شناسایی شده، پروتئين‌هایی که خاصیت حشره‌کشی دارند و یا در زهرآگینی باکتری Bt نقش دارند و برای هر کدام از آنها چندین پپتید متمایز کننده، مشخص و مخصوص شناسایی شده باشد، انتخاب شدند. در نهایت، پروتئين‌های انتخاب شده از طریق ابزارهای هم‌ترازی (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تأیید قرار گرفتند.

۲-۲-۱۴- تعیین محتوای ژنی

برای دستیابی به محتوای ژنی سویه‌های باکتری Bt، یکی از روش‌های معمول، شناسایی سویه‌ها بر اساس واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR^۱) می‌باشد. با آزمون‌های مبتنی بر PCR می‌توان به دقت و با سرعت محتوای ژنی سویه‌های باکتریایی را تعیین کرد (Carozzi *et al.*, 1991; Juárez-Pérez, *et al.*, 1997; Ferrandis *et al.*, 1999).

۲-۲-۱۴-۱- استخراج دی.ان.ای

استخراج و خالص‌سازی کل محتوای ژنومی به روش Ferrandis و همکاران (۱۹۹۹) انجام گرفت. برای شناسایی محتوای ژنی، ابتدا کل ژنوم، هم پلاسمیدی و هم کروموزومی سویه‌های باکتری Bt استخراج شد. به این ترتیب که کشت یک شبه از باکتری Bt در محیط جامد CCY تهیه شد. تک کلنی از باکتری انتخاب و چهار میلی‌لیتر از محیط کشت مایع LB با آن تلقیح شد. کشت مایع تهیه شده در شیکر انکوباتور به مدت یک شب در دمای ۲۹ درجه سلسیوس با دور ۱۸۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. سلول‌های باکتریایی رشد کرده، از طریق سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، از محیط کشت جدا شدند. برای استخراج دی.ان.ای از کیت Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (Hilden, Germany) طبق دستور شرکت سازنده، استفاده شد. سپس، کمیّت و کیفیت دی.ان.ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ Polymerase Chain Reaction



۲-۱۴-۲-۲- طراحی آغازگرها

برای شناسایی محتوای ژنی سویه‌های باکتری Bt، ابتدا روی ژن‌هایی تمرکز شد که پروتئین حاصل از آن‌ها توانایی تجمع در اجسام کریستال Bt را ندارند، مانند پروتئین‌های Vip و Sip که به ترتیب پروتئین‌های رویشی و ترش‌حی باکتری Bt هستند. همچنین پروتئین CryII، با اینکه در گروه پروتئین‌های Cry و در خانواده CryI قرار دارد، اما توانایی کریستالیزه شدن و تجمع در کریستال‌های پروتئینی باکتری Bt را ندارد. در نتیجه، آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *cryII* (Nazarian et al., 2009)، *vip1* و *vip2* (Hernández- Rodríguez et al., 2009)، *vip3* (Djanane et al., 2017) و ژن‌های *sip1* (پژوهش حاضر) تهیه شد. سپس با استفاده از آغازگرهای عمومی، ژن‌های *cry1* و *cry2* (Ben dov et al., 1997)، *cyt1* (Bravo et al., 1998)، *cyt2* (Guerchicoff et al., 2001)، *ps1* (Yasutake et al., 2007)، *ps2* و *ps4* (Lenina et al., 2014) ردیابی شدند. با توجه به تکثیر صحیح و مثبتی از قطعات ژن *cry1* توسط آغازگر عمومی و همچنین برای تأیید نتایج پروتئومیکس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر ژن‌های *cryIAa*، *cryIAb* و *cryIAd* (Juárez-Pérez et al., 1997)، *cryIAg* (پژوهش حاضر)، *cryIC* (Cho et al., 2001)، *cryID* (Juárez-Pérez et al., 1997)، *cryIG*، *cryIH* و *cryII* (پژوهش حاضر) بررسی شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) و SnapGene Viewer انجام گرفت. کنترل کیفی و فنی کلیه آغازگرهای طراحی شده از جمله طول آغازگر (تعداد بازها)، وزن مولکولی، ساختار ثانویه (سنجاق سری)، عدم ایجاد دایمر، دمای ذوب و درصد محتوای سیتوزین و گوانین، و سنتز آغازگرها توسط شرکت سیگما-آلدریج^۱ انجام گرفت. فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این رساله در جدول ۲-۳ آمده است.

^۱ Sigma-Aldrich

جدول ۲-۳- فهرست و اطلاعات آغازگرهاي مورد استفاده در اين رساله

Reference	Product size (base pair)	Melting temperature (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
Ben dov <i>et al.</i> , 1997	274-277	67.2	CATGATTCATGCGGCAGATAAA C	<i>cryI</i>	<i>Un1-f</i>
		66.7	TTGTGACACTTCTGCTTC CCA TT		<i>Un1-r</i>
Nazarian <i>et al.</i> , 2009	1000	48.1	ACAATTTACAGCTTATTAAG	<i>cryII</i>	<i>CryII-f</i>
		51.8	CTACATGTTACGCTCAATAT		<i>CryII-r</i>
Ben dov <i>et al.</i> , 1997	689-701	63.3	GTTATTCTTAATGCAGATGAAT GGG	<i>cry2</i>	<i>Un2-f</i>
		61.1	CGGATAAAAATAATCTGGGAAAT AGT		<i>Un2-r</i>
Bravo <i>et al.</i> , 1998	522	68.2	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG	<i>cyt1</i>	<i>Cyt1-f</i>
		63.9	GGTACACAATACATAACGCCAC C		<i>Cyt1-r</i>
Guerchicoff <i>et al.</i> , 2001	469	51.3	AATACATTTCAAGGAGCTA	<i>cyt2</i>	<i>Cyt2-f</i>
		48.4	TTTCATTTTAACTTCATATC		<i>Cyt2-r</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	585	70.9	TTATTAGATAAACAACAACAAG AATATCAATCTATTMGNTGGAT HGG	<i>vip1</i>	<i>Vip1-sc.fw</i>
		69.2	GATCTATATCTCTAGCTGCTTTT TCATAATCTSARTANGGRTC		<i>Vip1-sc.rev</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	845	61.2	GATAAAGAAAAAGCAAAAAGAA TGGGRNAARRA	<i>vip2</i>	<i>Vip2-sc.fw</i>
		65.8	CCACACCATCTATATACAGTAA TATTTTCTGGDATNGG		<i>Vip2-sc.rev</i>
Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009	1395	54.2	TGCCACTGGTATCAARGA	<i>vip3</i>	<i>Vip3-sc (f)</i>
		71.1	CCATTAATYGGAKTCAAAAATG TTTCACTGAT		<i>Vip3-scII (r)</i>
Yasutake <i>et al.</i> , 2007	1135	56.3	ATCAAGAATTTTCCGATAATC	<i>ps1</i>	<i>Ps1-f</i>
		57.6	CCAAAAGTGCCAGAATG		<i>Ps1-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	503	62.1	TGTTGGGACTGTTTCAGTACGT	<i>ps2</i>	<i>Ps2-f</i>
		60.7	CGTCACGGTACCTCTTAGTGT		<i>Ps2-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	701	65.4	GGAATCCAGGTGCACTGCT	<i>ps3</i>	<i>Ps3-f</i>
		66.9	GTCCCGGATCATACGTTGGA		<i>Ps3-r</i>
Lenina <i>et al.</i> , 2014	681	67.6	AGTGGTCTCCAGGCTCATACTG G	<i>ps4</i>	<i>Ps4-f</i>
		68.5	TGATATTCCTCGAACCTGCCCT		<i>Ps4-r</i>



ادامه‌ی جدول ۲-۲- فهرست و اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در این رساله

Reference	Product size (base pair)	Melting temperature (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
In current work	541	64.1	TCAAGCATGTCAGCTTTTGC	<i>sip1</i>	<i>Sip1A70D</i>
		63.7	CCAGCCAAAGCAACTACTCC		<i>Sip1A611R</i>
	420	63.3	TGCTGCTAAGGGAGTAGTTGC	<i>sip1</i>	<i>Sip1A582D</i>
		67	TGTAAATTCGGCCGGGGTAT		<i>Sip1A1002R</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1286	62.5	TTCCCTTTATTTGGGAATGC	<i>cryIAa</i>	<i>IAa</i>
		45.7	MDATYTCTAKRTCTTGACTA	<i>cryI</i>	<i>I(-)</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1371	61.9	CGGATGCTCATAGAGGAGAA	<i>cryIAb</i>	<i>IAb</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	844	54.6	GGAAACTTCTTTTAAATGG	<i>cryIAc</i>	<i>IAC</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1212	56.2	ACCCGACTGATCTCAACTA	<i>cryIAd</i>	<i>IAd</i>
In current work	1027	62.1	TCCGATTATGTTGTGGAATTG	<i>cryIAg</i>	<i>CryIAg-1F</i>
		62.2	ATGTGGTTGCCTATATTCTGGTT		<i>CryIAg-1R</i>
	1193	60.1	CACTTACTGTATTAGATATCGTTGCTC		<i>CryIAg-2F</i>
		63.1	ACCCGATTTGATTGGAAGAA		<i>CryIAg-2R</i>
	1172	62.2	TCCGTTTAACTTTTCAAATGGAT		<i>CryIAg-3F</i>
		62	CGCCCTTCTAATTCTTCAAAA		<i>CryIAg-3R</i>
	942	60.6	TCGTTTATAAAGAGGCAAAAAGAA		<i>CryIAg-4F</i>
		63.7	GAGGTGATGCCGTTTTTCATTA		<i>CryIAg-4R</i>
Cho <i>et al.</i> , 2001	1050	59.4	GGAGAAAGATGGGGATTG	<i>cryIC</i>	<i>CryIC-f</i>
		57.2	AACTCGTGCATCCCTACT		<i>CryIC-r</i>
Juárez-Pérez <i>et al.</i> , 1997	1138	61.5	CAGGCCTTGACAATTCAAAT	<i>cryID</i>	<i>CryID</i>
In current work	1244	61.9	GTTATGCCATGCTAGATTTGCTA	<i>cryIH</i>	<i>CryIH-f</i>
		62.5	ACCCATACACCTAAGTCCTCAT		<i>CryIH-r</i>
In current work	713	51.8	ATTACGAYATCCGAACATA	<i>cryIG</i>	<i>CryIG-f</i>
		51.5	CTGTAAAWCCTGGTCCT		<i>CryIG-r</i>

۲-۲-۱۴-۳- واکنش های زنجیره ای پلی مرز

برای تکثیر قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از آغازگرهای عمومی و یا اختصاصی، مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری به شرح جدول شماره ۲-۴ آماده گردید. در این واکنش از آنزیم دی.ان.ای پلی مرز *taq* ساخت شرکت بیوتولز^۱ و بافر استاندارد حاوی 50 MgCl_2 میلی مولار استفاده گردید. برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز مطابق جدول ۲-۵ تنظیم و در دستگاه^۲ Eppendorf Mastercycler thermal cycler انجام شد. محصولات حاصل از واکنش های زنجیره ای پلی مرز، روی ژل آگاروز یک درصد در سیستم بافری Tris-borate-EDTA مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی قطعات تکثیر شده ی مثبت، از ژل و یا از مخلوط واکنش توسط کیت^۳ NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit استخراج و برای تعیین توالی به شرکت^۴ Stab Vida ارسال شده است. ویرایش و آنالیز توالی های به دست آمده، در نرم افزار Geneious (version 10.0.9) و پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام گرفته است.

جدول ۲-۴- غلظت و حجم مواد تشکیل دهنده مخلوط واکنش های زنجیره ای پلی مرز

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl_2)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/ μl	1	0.04 U/ μl
dNTPs mix	10 mM	1	0.4 mM
Forward primer	10 μM	1	0.4 μM
Reverse primer	10 μM	1	0.4 μM
Template DNA	100 ng/ μl	1	4 ng/ μl
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

¹ Biotools B&M Labs, S.A. Madrid, Spain² Eppendorf AG, Barkhusenweg, Germany³ MACHEREY-NAGEL, Germany⁴ INVESTIGAÇÃO E SERVIÇOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LDA, Portugal

جدول ۲-۵- برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	45-67	45-60 sec	25-35
Extension	72	1-2 min (60 sec / 1Kbp)	
Final extension	72	10 min	1

۲-۲-۱۵- بررسی بتا اگزوتوکسین

وجود یا عدم وجود بتا اگزوتوکسین در رونشین کشت مایع هفت سوبیه‌ی مورد مطالعه از باکتری Bt، به روش LC-MS/MS در بخش پروتئومیکس دانشگاه والنسیا (SCSIE) تعیین شد. آماده‌سازی نمونه‌ها به روش Hernández و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت. به این ترتیب که ده میلی‌لیتر از محیط کشت مایع CCY، با یک کلنی از باکتری Bt، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه داشته شد. بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها به مدت ده دقیقه با دور $9000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. رونشین به میکروتیوب تمیزی منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس، فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد. دوباره نمونه‌ها به مدت ده دقیقه با دور $9000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. رونشین از فیلتر $0/2$ میکرومتری^۱ عبور داده شد. برای رسم منحنی استاندارد، به غلظت‌های متفاوتی از بتا اگزوتوکسین خالص و استاندارد (نوع یک) نیاز بود که از چهار غلظت ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و $100 \mu\text{g/ml}$ استفاده شد. بتا اگزوتوکسین (نوع یک) استاندارد از سویه *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 (Berliner) و از جانب Isabelle Thiéry^۲ تهیه شده بود. به‌عنوان شاهد مثبت از دو سویه‌ی HD-2 و *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* VMA10.30 و برای شاهد منفی از سویه HD-1 استفاده شد.

¹ GE Healthcare Whatman™, United Kingdom

² Institute Pasteur, France

۲-۱۶- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt با تمرکز بر آفات بال‌پولکدار

تاکنون اطلاعات مربوط به محتوای ژنی و پروتئینی هفت سویه از باکتری Bt حاصل شده است و با توجه به اطلاعات به دست آمده می‌توان دامنه‌ی میزبانی این هفت سویه را پیشگویی کرد. اما، با توجه به برهم‌کنش احتمالی بین توکسین‌های فعال تولید شده در روده‌ی میانی لارو میزبان، آزمایش‌های زیست‌سنجی اطلاعاتی تکمیلی برای شناسایی بهتر دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt ارائه می‌کنند. با توجه به اینکه، غربال‌گری اولیه‌ی ۱۳۰ جدایه‌ی ایرانی از باکتری Bt، بر اساس زهرآگینی آن‌ها روی لاروهای یک آفت بال‌پولکدار بوده است، و هفت سویه‌ی انتخابی بر این اساس انتخاب شده‌اند، دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt، با تمرکز روی آفات بال‌پولکدار تعیین گشت.

۲-۱۶-۱- فعالیت حشره‌کشی

فعالیت حشره‌کشی هفت سویه‌ی انتخابی با روش آلوده‌سازی سطحی^۱ (Hernández-Martínez et al., 2008) روی لاروهای سن یک *S. exigua*، *G. molesta*، *O. nubilalis* و *M. brassicae* بررسی شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی با پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی سویه‌های باکتری Bt در غلظت 1000 ng/cm^2 انجام گرفت. به این ترتیب که پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی باکتری Bt مطابق بند ۳-۱۲ تهیه شد. غلظت پروتئین‌های پیش‌توکسین به روش Bradford (۱۹۷۶) و غلظت توکسین‌های فعال شده با تریپسین بعد از جداسازی در ژل SDS-PAGE، به روش چگالی‌سنجی^۲ با کمک نرم‌افزار TotalLab Quant (version 12.3) و با استفاده از پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA^۳) تعیین گردید. غلظت 1000 ng/cm^2 از پیش‌توکسین و توکسین فعال هر یک از سویه‌ها تهیه شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی در سینی‌های پلی‌استیرن ۱۲۸ خانه‌ای با سطح یک سانتی‌متر مربع انجام شد. حجم ۵۰ میکرولیتر از پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی سویه‌های باکتری Bt، به هر چاهک از سینی‌های زیست‌سنجی اضافه و در سطح رژیم غذایی مصنوعی موجود در هر چاهک به خوبی پخش گردید. سینی‌های زیست‌سنجی زیر هود با جریان ملایم هوا قرار داده شدند تا خشک شوند. زمانی

¹ Surface Contamination

² Densitometry

³ Bovine Serum Albumin

که محلول پروتئینی (پیش توکسین یا توکسین فعال) اضافه شده در سطح ماده غذایی خشک شد، یک عدد لارو سن یک به هر چاهک منتقل شد. آزمایش های زیست سنجی در سه تکرار انجام و در هر تکرار تعداد ۴۸ لارو استفاده گردید. تعداد لاروهای مرده بعد از هفت روز ثبت و درصد مرگ محاسبه گردید. برای شاهد منفی، سطح رژیم غذایی مصنوعی به ۵۰ میکرولیتر بافر کربنات ۵۰ میلی مولار با pH ۱۰/۵، آغشته شد. درمورد شاهد مثبت، از توکسین فعال شده و پیش توکسین سویه ی استاندارد HD-1 استفاده گردید. سینی های زیست سنجی در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/هشت ساعت تاریکی نگهداری شد.

۲-۲-۱۶-۲- فعالیت سلول کشی

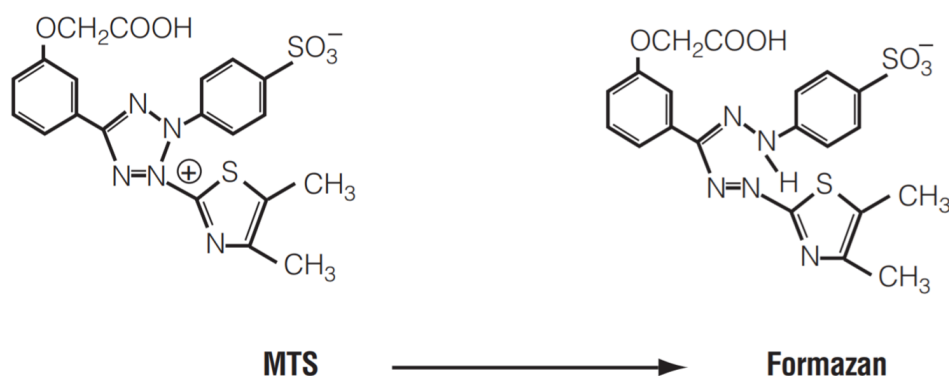
فعالیت سلول کشی سویه های انتخابی از باکتری Bt، در دو روش مشاهدات میکروسکوپی و آزمون های زنده مانی سلول، مورد بررسی قرار گرفت. آزمون زنده مانی سلول با استفاده از معرف CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent^۱ که اساس آن نمک های تترازولیوم^۲ یا MTT^۳ است، به روش احیاء^۳ نمک تترازولیوم انجام گرفت. روش احیاء نمک های تترازولیوم، یک روش رنگ سنجی است که تعداد سلول های زنده را مشخص می کند. ترکیبات تترازولیومی که توسط سلول های زنده احیاء می شوند، تبدیل به یک ماده ی رنگی به نام فورمازان^۴ می گردند که این ماده در محیط کشت سلول ها به صورت محلول وجود دارد (شکل ۲-۳). این تبدیل نمک تترازولیوم به ترکیب رنگی فورمازان، توسط NADPH یا NADH تولید شده از آنزیم های دهیدروژناز سلول هایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند، صورت می گیرد. مقدار ترکیب فورمازان تولید شده، از طریق میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر، اندازه گیری می شود. مقدار ترکیب فورمازان اندازه گیری شده، مستقیماً نسبتی از سلول های زنده ی موجود در محیط کشت سلولی می باشد.

¹ Promega Co., Madison, WI, USA

² MTT- 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl) 2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide

³ Reduction Method

⁴ Formazan



شکل ۲-۳- تبدیل نمک تترازولیوم به ترکیب رنگی فورمازان (Fotakis and Timbrell, 2006).

فعالیت سلول کشی توکسین های سویه های انتخابی از باکتری Bt، روی چهار رده ی سلولی از آفات بال پولکدار، Sf21، Hi5، UCR-SE و HzGUT مورد بررسی قرار گرفت. رده های سلولی مورد نظر، در محیط کشت مناسب سلول های حشرات حاوی FBS، در فلاسک های کشت سلولی ۲۵ سانتی متر مربعی نگه داشته شدند. برای انجام آزمون زنده مانگی سلول ها، محیط کشت سلولی قبلی حاوی FBS خارج گردید و محیط کشت تازه فاقد FBS به فلاسک اضافه گشت. سپس تک لایه ی متراکم سلول های رشد کرده با محیط کشت تازه به خوبی مخلوط شدند تا سوسپانسیون یکنواختی از سلول ها حاصل شود. غلظت سوسپانسیون تهیه شده با دستگاه Countess Automated Cell counter (Invitrogen) تعیین گشت. به این ترتیب که ده میکرولیتر از سوسپانسیون سلول با ده میکرولیتر از رنگ آبی تریپان^۱ در یک میکروتیوب تمیز به خوبی مخلوط شد و ده میکرولیتر از مخلوط حاصل به لام مخصوص دستگاه انتقال یافت. لام های این دستگاه از دو محفظه ی جداگانه ی A و B، برای تکرار تعیین غلظت، تشکیل شده است. حجم کل سلول های شمرده شده برابر با ۰/۴ میکرولیتر، معادل با چهار مربع ۱ mm × ۱ mm از لام هموسیتمتر استاندارد، می باشد. این دستگاه تعداد کل سلول های شمرده شده، تعداد سلول های زنده، تعداد سلول های مرده و درصد زنده مانگی را محاسبه می کند. سلول های زنده، بعد از رنگ آمیزی با رنگ آبی تریپان، حاشیه ای تیره و مرکزی روشن داشتند، اما سلول های مرده به صورت یک دست آبی بودند، زیرا رنگ آبی تریپان توانایی نفوذ به درون سلول مرده را دارد. به این ترتیب، غلظت

^۱ Trypan Blue

از 2×10^6 cells/ml سوسپانسیون سلول تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تعیین غلظت شده به هر چاهک از پلیت ۹۶-خانه‌ای افزوده شد. پلیت حاوی سلول به مدت حداقل دو ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد تا سلول‌ها زمان کافی برای اتصال به کف چاهک را داشته باشند. آزمون زنده‌مانی سلول به دو صورت انجام گرفت؛ ۱. آزمون تک غلظت^۱: اثر پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی سویه‌های باکتری Bt تنها در یک غلظت روی چهار رده‌ی سلولی بررسی شد، تا نتیجتاً حساس‌ترین رده‌ی سلولی و زهرآگین‌ترین سویه Bt، برای آزمون دز-پاسخ^۲ انتخاب گردد. ۲. آزمون دز-پاسخ: در این آزمون با استفاده از پنج غلظت از توکسین فعال شده‌ی زهرآگین‌ترین سویه‌ها در برابر حساس‌ترین رده‌ی سلولی، EC_{50} سویه‌های مورد نظر تعیین گشت.

برای آزمون‌های تک غلظت، ده میکرولیتر از پیش‌توکسین با غلظت یک $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ و ده میکرولیتر از توکسین فعال شده با غلظت $0.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، به هر سلول‌های موجود در هر چاهک پلیت ۹۶-خانه‌ای اضافه شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها، بعد از ۱۶ ساعت اندازه‌گیری شد. در آزمون دز-پاسخ، سلول‌های با ده میکرولیتر از توکسین فعال در پنج غلظت 0.64 ، $3/2$ ، 16 ، 80 و $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ تیمار شدند و تعداد سلول‌های زنده بعد از شش ساعت ثبت گردید. بعد از سپری شدن ۱۶ و ۶ ساعت از تیمار سلول‌ها با پیش‌توکسین و توکسین Bt، در آزمون‌های به ترتیب تک غلظت و دز-پاسخ، $20 \mu\text{l}$ از معرف CellTiter 96® Aqueous One Solution به هر چاهک اضافه و به مدت دو ساعت انکوبه شد. سپس، تعداد سلول‌های زنده از طریق اندازه‌گیری میزان جذب در طول 490 نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Tecan infinite Pro200) تعیین گشت. در شاهد منفی، سلول‌ها با بافر پروتئین (بافر کربنات 50 میلی‌مولار، $\text{pH } 10/5$) و در شاهد مثبت با TritonX-100 $0/2$ درصد، تیمار شدند. درصد زنده‌مانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$100 \times \left[\frac{\text{جذب شاهد مثبت} - \text{جذب شاهد منفی}}{\text{جذب شاهد مثبت} - \text{جذب نمونه}} \right] = \text{درصد زنده‌مانی}$$

¹ Single-Dose Assay

² Dose-Response Assay

۲-۳- نتايج و بحث

۲-۳-۱- جداسازي سويه هاي باكتري Bt

در اين رساله، در مجموع، از تعداد ۱۳۰ سويه باكتري Bt كه از منابع زيست محيطي متنوعي جداسازي شده بودند، استفاده گرديد. فهرستي از ۱۳۰ سويه باكتري Bt مورد استفاده در اين پژوهش در ضميمه رساله آورده شده است. از ميان سويه هاي انتخابي، ۸۸ سويه از كلکسيون بيمارگرهاي حشرات موجود در آزمايشگاه كنترل بيولوژيك آفات در گروه گياهپزشكي دانشگاه تهران گرفته شد و ۴۲ سويه در طي نمونه برداري براي اين رساله، از ۲۴ نمونه ي خاک و حشرات مرده و مشکوک به آلودگي جداسازي شد. سويه هاي باكتري Bt، در ابتدا، به روش انتخابي استات سدیم جداسازي و شناسايي شدند و سپس توانايي سويه ها در توليد اجسام كريستالي پاراسپورال معيار انتخاب قرار گرفت. در نهايت، پس از مشاهدات ميكروسكوبي، آزمون هاي گرم و تست کاتالاز، اطلاعات تکميلي در مورد سويه هاي انتخابي را فراهم آوردند. در نتيجه، بعد از تهيه ي اسلايد ميكروسكوبي و مشاهده ي سلول باكتريايي ميله اي شکل، تأييد حضور اسپور و كريستال، گرم مثبت بودن سويه ها و تأييد وجود آنزيم کاتالاز، Bt بودن ۴۲ سويه، محرز گرديد.

به دليل اهميت باكتري Bt در بحث كنترل بيولوژيك آفات، مطالعات زيادي بر جداسازي اين باكتري از منابع زيست محيطي متنوعي، تمرکز کرده اند (Bel et al., 1997; Uribe et al., 2003; Berón and Salerno, 2006; Seifinejad et al., 2008; Djenane et al., 2017). در اين رساله نيز ويژگي هاي سويه هاي ايراني از باكتري Bt، از منظر محتوای ژني و پروتئيني، و همچنين دامنه ي فعاليت حشره كشي، مورد مطالعه قرار گرفته است. البته، مجموعه هاي ديگري از سويه هاي ايراني باكتري Bt، در پژوهش هاي پيشين، بر مبنای تنوع جدايه هاي Bt، شناسايي ژن هاي اختصاصي و فعال *vip* و *cyt*، *cry* براي آفاتي از راسته هاي بال پولكداران، سخت بالپوشان و دوبالان و همچنين فعاليت نماتدكشي نيز مورد بررسي و مطالعه قرار گرفته اند (Salehi Jouzani et al., 2008a; Salehi Jouzani et al., 2008b; Seifinejad et al., 2008; Nazarian et al., 2009).

۲-۳-۲- غربال گری اولیه ی جدایه های باکتری Bt

غربال گری اولیه ای که روی ۱۳۰ سویه باکتری Bt انجام گرفت، بر اساس شدت بیماری زایی سویه های انتخابی، روی لاروهای سن دوم شب پره ی هندی (*P. interpunctella*)، در یک غلظت 10^8 اسپور بر میلی لیتر، بود. غلظت انتخابی (غلظت 10^8 اسپور بر میلی لیتر) برای انجام غربال گری اولیه، بر مبنای LC_{50} سویه ی مرجع *AzLp* که پیش تر زهر آگینی آن روی سایر آفت بال پولکدار (*Ectomyelois ceratoniae* *Plutella xylostella*) و *Ephestia kuehniella* ثابت شده بود (خرم نژاد، ۱۳۹۱) تعیین گشت. مقدار LC_{50} تخمین زده شده برای سویه ی *AzLp* روی لاروهای سن دوم شب پره ی هندی، 2×10^6 اسپور بر میلی لیتر می باشد (جدول ۲-۶).

جدول ۲-۶- نتایج تجزیه ی پروبیت با استفاده از Polo-Plus، جهت محاسبه LC_{50} سویه *AzLp*.

Bt strain	No.	Slope \pm SE	χ^2	df	LC_{50} (cells/ml)	C.I. 95%	
						Lower	upper
<i>AzLp</i>	360	5.316 ± 0.510	2	13	2.1×10^6	1.4×10^6	3.2×10^6

بر اساس نتایج غربال گری اولیه، ۱۳۰ سویه Bt، بر اساس شدت بیماری زایی روی لاروهای سن دوم *P.*

interpunctella، به سه گروه زهر آگین تقسیم بندی شدند (جدول ۲-۷).

جدول ۲-۷- گروه بندی سویه های Bt، بر اساس زهر آگینی آن ها روی لاروهای *Plodia interpunctella*

Sample habitat	Number of isolates causing mortality >67%	Number of isolates causing mortality 34-67%	Number of isolates causing mortality <34%
Infected larvae	5	0	0
Soil	2	4	120

پنج سویه ی از باکتری Bt: *IE-1*، *AzLp*، *IE-2*، *IP-2* و *IEp*، جدا شده از لاروهای آلوده، به همراه دو

سویه ی *DCf* و *MCh*، به ترتیب جداسازی شده از زمین کشاورزی (کاشت گل کلم) و باغ میوه (درختان آلبالو)،

بیش از ۶۷ درصد مرگ روی لاروهای سن دوم شب پره ی هندی ایجاد کردند و در زهر آگین ترین گروه، دسته بندی

شدند (جدول ۲-۸). نکته‌ی قابل توجه آنکه، تعداد ۱۱۹ سویه کمترین زهرآگینی (کمتر از ۳۴ درصد مرگ) را برای لاروهای *P. interpunctella* داشتند. تنها چهار سویه با ایجاد درصد مرگ بین ۳۴ تا ۶۷ درصد در گروه با زهرآگینی متوسط جای گرفتند. دو سویه‌ی IP-2 و IEp که برای لاروهای شب‌پره‌ی هندی به شدت بیماری‌زا بودند، از لاروهای آلوده متعلق به خانوادگی Pyralidae از راسته‌ی Lepidoptera جداسازی شده بودند.

جدول ۲-۸- زهرآگینی مخلوط اسپور و کریستال سویه‌های Bt، روی لاروهای *Plodia interpunctella*

Bt strain	Sample source	Mortality% \pm SE ¹
IE-1	<i>Ectomyelois ceratoniae</i> larvae	67 \pm 3 ^{bc}
AzLp	<i>Plodia interpunctella</i> larvae	68 \pm 6 ^{bc}
IE-2	<i>Ectomyelois ceratoniae</i> larvae	88 \pm 4 ^{ab}
IP-2	<i>Plodia interpunctella</i> larvae	100 \pm 0 ^a
IEp	<i>Ephestia kuehniella</i> larvae	100 \pm 0 ^a
DCf	Agricultural field (Cauliflower)	87 \pm 7 ^{ab}
MCh	Fruit garden (Cherry)	67 \pm 12 ^{bc}

(۱) حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود تفاوت آماری معنی‌دار (Tukey test p-value <0.05) بین میانگین درصد مرگ سویه‌های Bt می‌باشد.

برای مطالعات بعدی، پنج سویه‌ی زهرآگین باکتری Bt (IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEp) با کریستال‌های دو هرمی شکل به همراه دو سویه‌ی KhF متعلق به گروه با زهرآگینی متوسط (۲ \pm ۴۲ درصد مرگ) و RM عضو گروه با زهرآگینی کم (۰ \pm ۰ درصد مرگ)، که به ترتیب کریستال‌های کروی و نامنظم تولید می‌کنند، انتخاب و با جزئیات بیشتری مورد مطالعه قرار گرفتند. دلیل انتخاب دو سویه KhF و RM، مقایسه‌ی خصوصیات و ویژگی‌های آن‌ها با سویه‌های زهرآگین‌تر بود.

نتایج غربال‌گری اولیه‌ی سویه‌های ایرانی باکتری Bt نشان داد که تعداد بسیاری کمی از سویه‌های مورد بررسی، ۷ سویه از ۱۳۰ سویه علیه لاروهای سن دوم شب‌پره‌ی هندی فعالیت حشره‌کشی داشتند. پژوهش‌های پیشین، حساسیت لاروهای *P. interpunctella* را به پروتئین‌های Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry1Ad، Cry1B، Cry1C، Cry1D، Cry1E، Cry1F، Cry1I، Cry2A، Cry9، Cry39 و Cry49 نشان داده‌اند

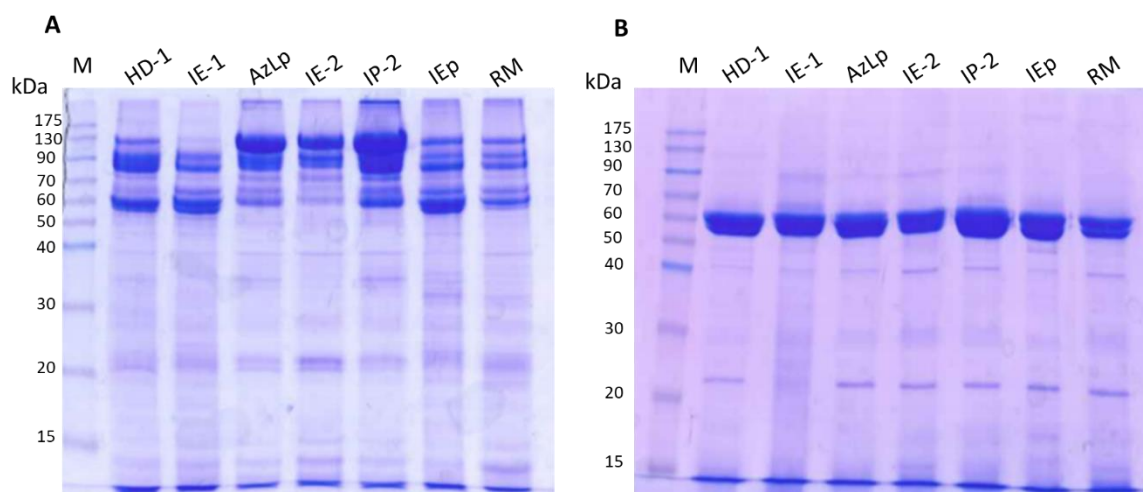
(Gryspeirt and Gregoire 2012; Shojaaddini et al., 2012). مقدار LC₅₀ تخمین زده شده برای سویه های AzLp برابر با 2×10^6 اسپور بر میلی لیتر یا اسپور بر گرم می باشد، این مقدار مشابه LC₅₀ محاسبه شده از مخلوط اسپور و کریستال سویه ی SY49.1، $147/33 \mu\text{g/g}$ ، معادل با 2×10^6 اسپور بر گرم در برابر لاروهای *P. interpunctella* می باشد (Yilmaz et al., 2012).

در بخش اول این رساله که هدف تعیین ویژگی های سویه های جدید ایرانی از باکتری Bt بود، سویه های باکتری Bt با پتانسیل حشره کشی علیه لاروهای *P. interpunctella*، بر اساس پروفایل پروتئینی، محتوای ژنی (ژن های *cry*، *cyt*، *vip*، *sip* و *ps*)، محتوای پروتئین های موجود در کریستال، دامنه ی فعالیت حشره کشی، فعالیت سلول کشی و تولید بتا-اگزوتوکسین به طور جامع بررسی شدند. مطالعات مذکور، با دقت روی هفت سویه ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2، IEp، KhF و RM صورت گرفت.

۲-۳-۳- مقایسه ی پروفایل پروتئینی جدایه های باکتری Bt

برای بررسی الگوهای پروتئینی و تفکیک پروتئین های موجود در کریستال های هفت سویه از باکتری Bt، از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید. پروفایل پروتئینی سویه ی استاندارد مورد استفاده، HD1، مشابه سویه های انتخابی از باکتری Bt، بود. به این ترتیب که دو باند اصلی ۶۰ و ۱۳۰ کیلودالتون در سویه ها مشاهده شد. پیش تر مشخص شده که سویه ی استاندارد HD1، پروتئین های *Cry1Aa*، *Cry1Ab*، *Cry1Ac* و *Cry2Aa* تولید می کند (Schnepf et al., 1998). این ترکیب پروتئین های نام برده شده، مشاهده ی دو باند اصلی ۱۳۰ کیلودالتون (متناظر با پروتئین های *Cry1*) و ۶۵ کیلودالتون (مطابق با پروتئین های *Cry2*) را توجیه می کند. همچنین، مشاهده ی باندهای دیگر بین دو باند اصلی ۱۳۰ و ۶۰ کیلودالتون، به دلیل پروتئولیز بخشی از پروتئین های مورد نظر بوده است. مشابه با سویه ی مرجع HD1، در سویه های مورد آزمون نیز، باندی با اندازه ی ۱۳۰ کیلودالتون مشاهده گردید، که می تواند با پروتئین های *Cry1*، *Cry7*، *Cry8* و *Cry9* مطابقت داشته باشد (Arrieta et al., 2004). پروتئین های موجود در کریستال های سویه های IE-1، IP-2 و IEp، باند ۶۵ تا ۷۵ کیلودالتونی دیگری، احتمالاً متناظر با پروتئین های *Cry2*، *Cry3* و *Cry22* داشتند (شکل ۲-۴، تصویر A). بعد از فعال کردن پیش توکسین های به دست آمده با آنزیم تریپسین، پروفایل پروتئینی توکسین های سویه های باکتری

Bt نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، پروفایل پروتئین یکسانی، متشکل از یک باند اصلی ۶۰ کیلودالتونی، برای همه‌ی سویه‌ها حاصل شد (شکل ۲-۴، تصویر B). باند به دست آمده بعد از فعال‌سازی پیش‌توکسین‌ها، وزن مولکولی رایج در بین توکسین‌های فعال شده‌ی پروتئین‌های Cry می‌باشد. مشابه همین باند در سویه‌ی مرجع HD1 نیز به دست آمد.



شکل ۲-۴- الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های موجود در کریستال. تصویر A؛ پیش‌توکسین‌ها و تصویر B؛ توکسین‌های فعال شده را نشان می‌دهد. اسامی سویه‌های باکتری در بالای هر ستون، درج شده است. M؛ مارکر پروتئینی (Pink restained protein ladder, Nippon Genetics) و HD1؛ سویه‌ی مرجع باکتری Bt می‌باشد.

۲-۳-۴- تعیین محتوای پروتئینی کریستال‌های باکتری Bt به روش LC-MS/MS

پروتئین‌های با خاصیت حشره‌کشی موجود در کریستال‌های هر یک از سویه‌های باکتری Bt، با استفاده از روش LC-MS/MS آنالیز شدند. از میان فهرست کل پروتئین‌های شناسایی شده در کریستال Bt، بر اساس معیارهای خاصی، پروتئین‌های با خاصیت حشره‌کشی بازیابی شدند. وجود چندین پپتید متمایز کننده، مشخص و مخصوص برای هر پروتئین شناسایی شده، از جمله مهم‌ترین معیارهای اتخاذ شده برای شناسایی محتوای پروتئینی کریستال‌های سویه‌های باکتری Bt بود. در نهایت، پروتئین‌های انتخاب شده از طریق ابزارهای هم‌ترازی



(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تأیید قرار گرفتند. پروتئین های شناسایی شده برای هر سویه، با توجه به فراوانی نسبی آن پروتئین در کریستال ها دسته بندی شدند (جدول ۲-۹). نتایج LC-MS/MS حاکی از آن بود که مخلوطی از پروتئین های Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da و Cry2Aa در کریستال های سویه های انتخابی از باکتری Bt وجود دارد. پروتئین های خانواده ی Cry1A بیشترین فراوانی را در بین پروتئین های شناسایی شده، داشتند. پروتئین Cry1Ac، تنها پروتئین شناسایی شده در سویه ی RM بود.

نکته ی قابل توجه آنکه هیچ پروتئین کریستالی حشره کش شناخته شده ای در کریستال های سویه ی KhF یافت نشد. یکی از معایب شناسایی محتوای پروتئینی کریستال ها با روش LC-MS/MS به کار گرفته شده در این رساله این است که احتمال شناسایی پروتئین های جدید بسیار کم است. زیرا نرم افزار Protein Pilot v (ABSciex) 4.5 از پایگاه اطلاعاتی NCBI برای شناسایی پپتیدهای به دست آمده کمک می گیرد، در نتیجه تنها پروتئین های شناخته شده ای که فهرست آن ها در NCBI و یا 'UniProt' (بانک اطلاعاتی توالی پروتئین) وجود داشته باشد، شناسایی می گردد و در صورت وجود موارد جدید، اطلاعات مربوط به آن پروتئین ها از دست می رود. در نتیجه، احتمالاً پروتئین های کریستالی حشره کش سویه ی KhF، زیر سطح شناسایی الگوریتم های به کار گرفته شده در نرم افزار مورد استفاده بودند، به این مفهوم که سویه KhF پروتئین های حشره کش جدیدی دارد. البته این احتمال هم وجود دارد که هیچ پروتئین کریستالی حشره کشی در کریستال های کروی شکل سویه ی KhF وجود ندارد.

¹ <https://www.uniprot.org/>

جدول ۲-۹- فهرست پروتئين هاي كريستالى حشره كش شناسايى شده توسط LC-MS/MS.

Isolate	N ¹	Unused ²	Coverage% ³	Accession	Name	Peptides (95%)	N* ⁴
IE-1	1	418.24	89.3	sp P05068	Cry1Ac	1237	522
	2	117.09	85.2	sp P0A368	Cry1Aa	1038	123
	3	74.5	71.56	sp P0A377	Cry2Aa	205	81
AzLp	1	303.97	83.46	sp P0A372	Cry1Ab	572	357
	2	156.25	74.43	sp P0A376	Cry1Ca	332	154
	4	58.62	82.57	sp P0A367	Cry1Aa	505	71
	24	19.26	37.6	sp P19415	Cry1Da	162	19
	45	10.34	73.26	sp P05068	Cry1Ac	394	7
IE-2	1	132.98	66.36	gi 757772063	Cry1Ca	714	92
	2	88.92	62.5	gi 757747932	Cry1Aa	695	61
	3	54.72	57.17	gi 757772066	Cry1Da	67	33
IP-2	1	370.36	87.88	sp P0A372	Cry1Ab	965	433
	2	183.02	74.18	sp P0A375	Cry1Ca	619	178
	3	109.98	72.88	sp P19415	Cry1Da	425	81
	4	73.1	85.46	sp P0A367	Cry1Aa	877	78
IEp	1	457.69	90.66	sp P05068	Cry1Ac	1249	540
	2	93.02	79.62	sp P0A377	Cry2Aa	256	105
RM	1	337.53	75.21	sp P05068	Cry1Ac	494	360

- (۱) رتبه پروتئين شناسايى شده در ميان كل پروتئين هاي شناسايى شده در هر سويه.
- (۲) تعداد پپتيد: تعداد توالى هاي پپتيدى بدون تكرار با طول بيش از شش اسيد آمينه كه به پروتئين شناسايى شده، نسبت داده شده است.
- (۳) درصد پوشش: درصدى از پروتئين كه توسط كل پپتيد هاي شناسايى شده براى آن پروتئين پوشش داده مى شود.
- (۴) پپتيد هاي اختصاصى: تعداد پپتيد هاي اختصاصى و متمايز كننده اى كه تنها با پروتئين شناسايى شده، مطابقت دارد.

محتواى پروتئين هاي Cry شناسايى شده، پس از تجزيه و تحليل نتايج LC-MS/MS نشان داد كه دو

سويه اى كه باعث مرگ صد درصدى لارو هاي سن دوم *P. interpunctella*، شدند؛ IP-2 و IEp، محتواى

پروتئينى كاملاً متفاوتى داشتند. مقايسه اى بين نتايج زيست سنجى و پروتئوميكس نشان داد كه نه تنها محتواى

پروتئینی کریستال‌های سویه‌های باکتری Bt، بلکه فراوانی نسبی پروتئین‌های موجود در کریستال نیز در شدت بیماری‌زایی، حائز اهمیت می‌باشد. یک دلیل موجه برای ثابت کردن این ادعا، مقایسه‌ی محتوای پروتئینی و شدت بیماری‌زایی سه سویه‌ی IE-1، RM و IEP می‌باشد. این سه سویه، پروفایل پروتئینی تقریباً مشابهی دارند، اما زهرآگینی متفاوتی علیه لاروهای *P. interpunctella* داشتند.

۲-۳-۵- تعیین محتوای ژنی

غربال‌گری بر مبنای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، به منظور شناسایی ژن‌های حشره‌کش موجود در سویه‌های باکتری Bt انجام گرفت. در ابتدا، روی ژن‌هایی تمرکز شد که پروتئین حاصل از آن ژن‌ها در اجسام کریستالی مجتمع نمی‌شوند؛ *cryII*، *vip1*، *vip2*، *vip3* و *sip1*. سپس ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی که در طی فاز اسپورزایی درون اجسام کریستالی جمع می‌شوند؛ خانواده‌های ژنی *cry*، *cyt* و *ps* بررسی شدند. در نهایت، برای تأیید نتایج پروتئومیکس، ژن‌های مربوط به پروتئین‌های گزارش شده توسط LC-MS/MS ردیابی گشت. نتایج مطالعه محتوای ژنی سویه‌های انتخابی باکتری Bt نشان داد که ژن *cry2* در تمامی سویه‌های مورد آزمون وجود دارد. اما در مقابل ژن‌های *cryIAd*، *cryIAG*، *cryIH*، *cryIG*، *cyt1*، *cyt2*، *vip1*، *vip2*، *sip1* و *ps1* وجود دارد. *ps2*، *ps3* و *ps4* در هیچ یک از سویه‌های مورد مطالعه تکثیر نگردید. تکثیر ژن‌های *cryII*، *cryIAC* و *vip3* در سویه‌های IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEP مثبت بوده است. سویه‌های IE-1، AzLp، IE-2 و IP-2 ژن *cryIAa* را داشتند. دو ژن *cryID* و *cryIC* در سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 یافت شد (جدول ۲-۱۰).

در بسیاری از پژوهش‌های مربوط به شناسایی و تعیین ویژگی سویه‌های باکتری Bt، از روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور تعیین محتوای ژنی و پیش‌گویی دامنه‌ی میزبانی سویه‌های مورد بررسی استفاده می‌کنند (Ferrandis et al., 1999; Juárez-Pérez et al., 1997). اما، این تکنیک دقیق و سریع، توانایی نشان دادن بیان ژن‌های شناسایی شده را ندارد. در نتیجه، در این پژوهش، از مطالعات پروتئومیکس برای تکمیل نتایج تعیین محتوای ژنی، بهره گرفته شد.

جدول ۲-۱۰- پراکنش ژن های *cry*، *cyt*، *vip*، *sip* و *ps* در سویه های باکتری *Bt* بررسی شده با واکنش زنجیره ای پلی مرز (علامت +، نشان دهنده ی حضور ژن و علامت -، نشانی از عدم حضور ژن می باشد).

KhF	RM	IEp	IP-2	IE-2	AzLp	IE-1	Genes
-	+	+	+	+	+	+	<i>cryI</i>
-	-	-	+	+	+	+	<i>cryIAa</i>
-	-	-	+	-	+	-	<i>cryIAb</i>
-	+	+	+	+	+	+	<i>cryIAc</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>cryIAd</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>cryIAg</i>
-	-	-	+	+	+	-	<i>cryIC</i>
-	-	-	+	+	+	-	<i>cryID</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>cryIG</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>cryIH</i>
-	-	+	+	+	+	+	<i>cryII</i>
+	+	+	+	+	+	+	<i>cry2</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>cyt1-2</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>vip1-2</i>
-	-	+	+	+	+	+	<i>vip3</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>sip1</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>ps1-4</i>

به طور کلی، نتایج تعیین محتوای ژنی با پروتئومیکس، تطابق داشتند. به این مفهوم که ژن پروتئین های گزارش شده در نتایج LC-MS/MS، توسط واکنش های زنجیره ای پلی مرز شناسایی گردیده است. اما، این تطابق همیشه در جهت عکس اتفاق نمی افتد. برای مثال؛ ژن *cry2* در تمامی سویه های *Bt* مورد آزمون، تکثیر شد اما پروتئین *Cry2*، تنها در سویه های IE-1 و IEp، شناسایی گردید. همچنین، ژن *cryIAc* در دو سویه ی IE-2 و IP-2 یافت شد، اما پروتئین حاصل از آن در کریستال وجود نداشت. در نتیجه، ردیابی ژن های به وسیله ی PCR، برای پیش گویی محتوای پروتئینی احتمالی کریستال های باکتری *Bt* مفید می باشد. ژن های خانواده ی *cryI*، در تمام سویه های مورد بررسی به غیر از KhF یافت شدند. تکثیر ژن *cryI* با مشاهده ی باند ۱۳۰ کیلو دالتونی در نتایج الکتروفورز SDS-PAGE و همچنین نتایج پروتئومیکس تطابق کامل داشت. مطابق با نتایج این پژوهش، در مجموعه های چینی (Wang et al., 2003) و ایرانی (Seifinejad et al., 2008) از باکتری *Bt*، ژن های *cryIH* و *cryIG* به ندرت یافت شده اند. نتایج برخی پژوهش های پیشین (Uribe et al., 2003);

Thammasittirong and Attathom 2008) نشان داده که ژن *cryIG* در مجموعه‌ی سویه‌های Bt مورد بررسی آن‌ها، بیشترین فراوانی را در بین ژن‌های شناسایی شده، داشته است. در حالی که نتایج به دست آمده در این رساله متفاوت بوده و ژن *cry2* بیشترین فراوانی را در بین ژن‌های شناخته شده، داشته است، مطابق با گزارشات مطالعات دیگر که به فراوانی زیاد ژن *cry2* اشاره کرده‌اند (Porcar and Juárez-Pérez 2003; Seifinejad et al., 2008). در مورد فراوانی ژن‌های *vip* و *sip*، در این رساله و مطالعات دیگر، بسته به منشاء و محل نمونه‌برداری نتایج متفاوتی حاصل شده است (Salehi Jouzani et al., 2008; Seifinejad et al., 2008; Hernandez-Rodriguez et al., 2009; Djenane et al., 2017).

۲-۳-۶- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt

دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین سویه‌های انتخابی از باکتری Bt به‌همراه سویه مرجع HD1، در برابر لاروهای سن یک *S. exigua*، *G. molesta*، *M. brassicae* و *O. nubilalis* مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲-۱۱). نتایج به دست آمده نشان داد که *G. molesta* و *O. nubilalis* حساس‌ترین آفات میزبان بودند. درجات متفاوتی از درصد مرگ لاروهای سن یک *S. exigua* و *M. brassicae* تیمار شده با توکسین و پیش‌توکسین سویه‌های باکتری Bt مشاهده گردید. در آن بین، پیش‌توکسین و توکسین سویه‌های AzLp، IE-2 و IP-2 شدت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها و حتی سویه‌ی مرجع (HD1) داشتند. پیش‌توکسین‌های سویه‌ی KhF هیچ خاصیت کشندگی و مهارکنندگی رشدی در برابر میزبان‌های مورد آزمون نداشتند. فعالیت حشره‌کشی توکسین‌های فعال شده‌ی سویه‌ی KhF مورد بررسی قرار نگرفت، زیرا حل کردن کریستال‌های کروی شکل سویه‌ی KhF با وجود آزمودن pH و بافرهای متفاوت امکان‌پذیر نبود.



جدول ۲-۱۱- فعالیت حشره‌کشی هفت سویه‌ی ایرانی باکتری Bt و سویه مرجع HD-1. ارزش‌های نوشته شده در جدول، میانگین درصد مرگ \pm خطای معیار می‌باشد.

Strain	Protoxin (1000 ng/cm ²)				Trypsin activated (1000 ng/cm ²)			
	<i>S. exigua</i>	<i>G. molesta</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>M. brassicae</i>	<i>S. exigua</i>	<i>G. molesta</i>	<i>O. nubilalis</i>	<i>M. brassicae</i>
HD1	6 \pm 4 ^{c*}	99 \pm 1 ^a	100 \pm 0 ^a	38 \pm 13 ^b	10 \pm 5 ^c	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	60 \pm 11 ^{ab}
IE-1	56 \pm 7 ^b	99 \pm 1 ^a	94 \pm 6 ^a	8 \pm 2 ^c	48 \pm 8 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	41 \pm 17 ^{bc}
AzLp	99 \pm 1 ^a	99 \pm 1 ^a	98 \pm 2 ^a	94 \pm 4 ^a	97 \pm 3 ^a	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a
IE-2	95 \pm 4 ^a	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	79 \pm 13 ^a	96 \pm 4 ^a	100 \pm 0	86 \pm 7 ^a	82 \pm 17 ^{ab}
IP-2	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	97 \pm 2 ^a	98 \pm 0 ^a	100 \pm 0	98 \pm 2 ^a	100 \pm 0 ^a
IEp	41 \pm 11 ^b	100 \pm 0 ^a	92 \pm 2 ^a	22 \pm 7 ^{bc}	55 \pm 3 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	24 \pm 14 ^{bc}
RM	20 \pm 9 ^{bc}	100 \pm 0 ^a	98 \pm 2 ^a	8 \pm 6 ^c	42 \pm 10 ^b	100 \pm 0	100 \pm 0 ^a	29 \pm 9 ^{bc}
KhF	2 \pm 2 ^c	25 \pm 3.5 ^b	2 \pm 2 ^b	4 \pm 2 ^c	-	-	-	-
ANOVA statistics								
F-value	47.8	383.8	139.4	44.1	33.3	-	3.1	7.6
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	0.038	0.0009

*نتایج تجزیه‌ی آماری ANOVA برای هر ستون آورده شده است. حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار (Tukey test p-value <0.05)،

بین سویه‌های باکتری Bt، می‌باشد.

(۲) علامت (-)، به مفهوم آزمون نشده می‌باشد.

بررسی دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی سویه‌های باکتری Bt، محدود به چهار خانواده‌ی Noctuidae، Tortricidae، Crambidae و Pyralidae از راسته‌ی بال پولکداران بود. نتیجه‌ی آزمون‌های زیست‌سنجی نشان داد که سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 زهرآگینی زیادی، بیشتر از سویه‌ی مرجع برای لاروهای سن یک *S. exigua* و *M. brassicae* داشتند. حساسیت لاروهای *S. exigua* به توکسین‌های Cry1C و Cry1D (Hernández-Martínez et al., 2008) و حساسیت لاروهای سن یک *M. brassicae* به توکسین Cry1C (Gilliland et al., 2002) از پیش مشخص بود. در نتیجه، از مقایسه‌ی نتایج پروتئومیکس و فعالیت حشره‌کشی معلوم گردید که سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 تولید کننده‌ی توکسین Cry1C بودند به همین دلیل بیشترین زهرآگینی را روی لاروهای مذکور داشتند.

کرم هلو، *G. molesta*، حساس‌ترین میزبان در این پژوهش بود که این حساسیت به دلیل زهرآگین بودن توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ac و Cry1C برای این آفت بوده است (Scaramal Ricietto et al., 2016). پژوهش‌های پیشین (Hernández-Martínez et al., 2008) نشان داده شده که توکسین Cry1Ac برای لاروهای *S. exigua* زهرآگین نیست، نتایج این رساله نیز نشان داد که سویه‌ی RM که بر اساس نتایج پروتئومیکس تنها توکسین Cry1Ac در اجسام کریستالی خود دارد، برای لاروهای *S. exigua* زهرآگینی ندارد. مطالعات زیادی حساسیت لاروهای *O. nubilalis* را نسبت به توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry1Fa، Cry1Ie2، Cry9Ca و Cry9E گزارش کرده‌اند (van Frankenhuyzen 2009; Zhao et al., 2015). در نتیجه، با توجه به وجود توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ab و Cry1Ac در سویه‌های مورد بررسی از باکتری Bt، حساسیت لاروهای *O. nubilalis* مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج زیست‌سنجی با پیش‌توکسین‌های سویه‌ی KhF نشان داد که این سویه برای هیچ یک از حشرات مورد استفاده، زهرآگین نمی‌باشد. نتایج تعیین محتوای ژنی نیز تنها وجود ژن *cry2* را در این سویه نشان داده است. لازم به ذکر است که نتایج پروتئومیکس پس از سه بار تکرار هیچ پروتئین کریستالی حشره‌کشی شناخته شده‌ای را در کریستال‌های این سویه یافت نکرد. اما، مخلوط اسپور و کریستال سویه‌ی KhF برای لاروهای سن دوم *P. interpunctella* زهرآگینی متوسط، و برای لاروهای سن یک *G. molesta* زهرآگینی شدید داشته

است. این زهرآگینی می‌تواند به دلیل وجود فاکتورهای زهرآگین؛ مهارکننده‌های ایمنی و باسیولولیزین^۱ در این سویه از باکتری باشد که طی تجزیه و تحلیل نتایج پروتئومیکس یافت شده‌اند.

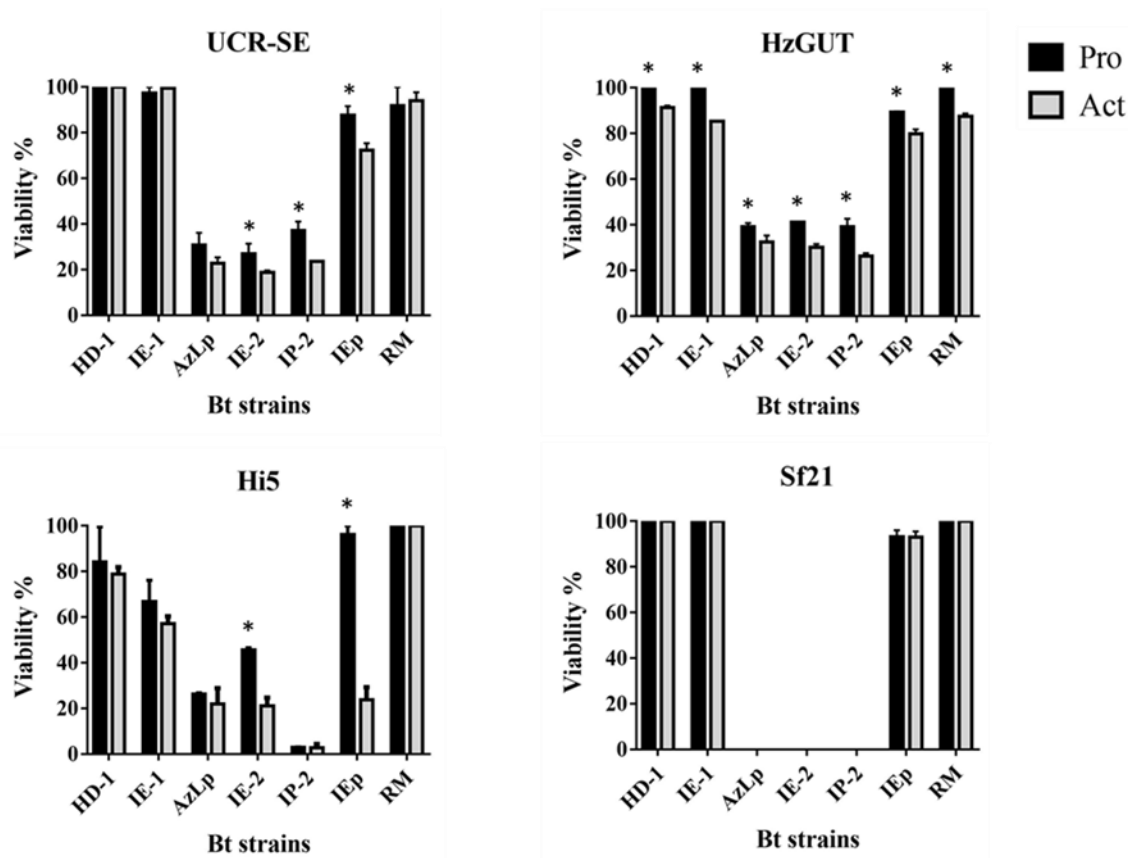
۲-۳-۷- ارزیابی دامنه‌ی فعالیت سلول‌کشی سویه‌های باکتری Bt

دامنه‌ی فعالیت سلول‌کشی (به مفهوم فقدان فعالیت متابولیکی) سویه‌های انتخابی از باکتری Bt و سویه‌ی مرجع HD-1، در برابر چهار رده‌ی سلولی متفاوت از آفات بال‌پولکدار مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا، زهرآگینی پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی سویه‌های Bt، تنها در یک غلظت روی رده‌های سلولی مورد نظر، مطالعه گردید. شکل ۲-۵، نتایج به دست آمده از فعالیت سلول‌کشی سویه‌های Bt (درصد زنده‌مانی سلول‌ها) را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، حساسیت سلول‌های HzGUT نسبت به پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی تمام سویه‌های Bt آزمون شده، تفاوت معنی‌دار (p-values از 0.0001 تا 0.00268) داشته است، در حالی که سلول‌های Sf21 حساسیت متفاوتی نسبت به پیش‌توکسین و توکسین فعال شده نداشتند. همچنین، درصد سلول‌های زنده‌ی دو رده‌ی سلولی UCR-SE و Hi5 زمانی که با پیش‌توکسین و توکسین فعال سویه‌های IE-2 (p-value به ترتیب؛ 0.0004 و 0.0001) و IEp (p-value به ترتیب؛ 0.0057 و 0.0001) تیمار شدند، تفاوت معنی‌دار وجود داشته است. اما، تفاوت در فعالیت سلول‌کشی سویه‌های مختلف باکتری Bt را می‌توان به وجود پروتئازهای متفاوت در غشای سلول‌ها نسبت داد، زیرا این پروتئازها در فعال‌سازی پروتئین‌های Cry، نقش بسزایی ایفا می‌کنند.

به‌طور کلی، پروتئین‌های سویه‌ی Bt HD1، فعالیت سلول‌کشی یکسانی برای تمامی رده‌های سلولی مورد آزمون داشتند. میانگین درصد سلول‌های زنده هر چهار رده‌ی سلولی تیمار شده با سویه‌ی HD1 برابر با ۹۴ درصد، بوده است. پروتئین‌های سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 برای هر چهار رده‌ی سلولی به‌شدت زهرآگین بودند، به طوری که باعث کاهش زنده‌مانی ۶۰ تا ۱۰۰ درصدی سلول‌های تیمار شده، گشتند. در واقع، پس از اینکه سلول‌های Sf21، به مدت ۱۶ ساعت در معرض پروتئین‌های سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 قرار گرفتند، هیچ سلول زنده‌ای مشاهده نگردید. پروتئین‌های دو سویه‌ی IE-1 و RM کمترین زهرآگینی را برای

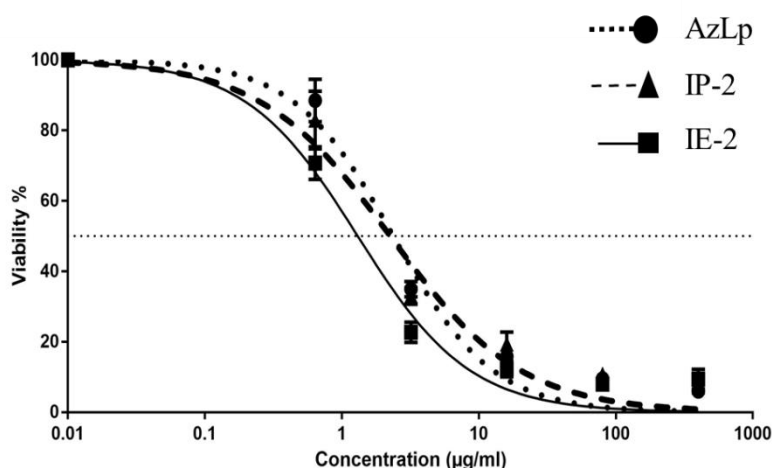
¹ Bacillolysin

رده‌های سلولی آزمون شده داشتند. به عبارتی، میانگین درصد سلول‌های زنده پس از تیمار شدن با پروتئین‌های دو سویه IE-1 و RM، برابر با ۹۲ درصد بوده است. زهرآگینی پیش‌توکسین‌های سویه‌ی IEP برای تمامی سلول‌ها یکسان و به طور متوسط هشت درصد (۹۲ درصد زنده‌مانی سلول‌ها) محاسبه گردید، در حالی که، زهرآگینی توکسین‌های فعال شده‌ی این سویه بین ۲۴ تا ۹۳ درصد بوده است.



شکل ۲-۵- حساسیت سلول‌های UCR-SE، HzGUT، Hi5 و Sf21 به پیش‌توکسین (Pro) و توکسین فعال شده (Act) سویه‌های باکتری Bt. ستون‌ها در این نمودار، میانگین درصد سلول‌های زنده، پس از آنکه ۱۶ ساعت در معرض پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی سویه‌های باکتری Bt، قرار گرفتند را نشان می‌دهد. خطای معیار در به صورت میله‌های بالای هر ستون، نشان داده شده است. علامت (*) به مفهوم تفاوت آماری معنی‌دار بین توکسین فعال شده و پیش‌توکسین در هر تیمار (t-test, $p < 0.05$)، می‌باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون درصد زنده‌مانی سلول‌ها در تک غلظت، رده‌ی سلولی Sf21، به‌عنوان حساس‌ترین رده‌ی سلولی و سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2، به‌عنوان زهرآگین‌ترین سویه‌ها، معرفی شدند. در نتیجه، برای تحقیق و بررسی دقیق‌تر، آزمون‌های دز-پاسخ روی حساسیت رده‌ی سلولی Sf21 نسبت به توکسین‌های سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2، صورت گرفت. نتایج حاکی از آن بود که، زنده‌مانی سلول‌های Sf21، با افزایش غلظت توکسین‌های مورد استفاده، کاهش می‌یابد (شکل ۲-۶). مقدار EC_{50} سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2، محاسبه گردید و نتایج تجزیه‌ی آماری نشان می‌دهد که، دو سویه‌ی IE-2 و IP-2، زهرآگینی بیشتری داشتند (جدول ۲-۱۲).

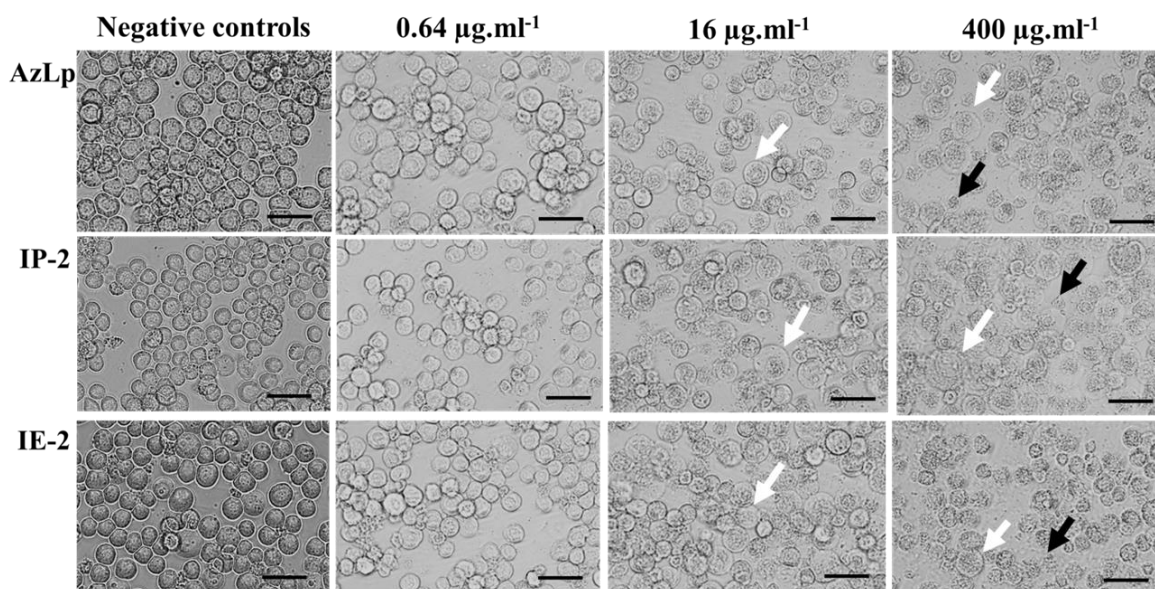


شکل ۲-۶- منحنی دز-پاسخ درصد زنده‌مانی سلول‌های Sf21 که در معرض توکسین‌های AzLp، IE-2 و IP-2 قرار داشتند.

جدول ۲-۱۲- غلظت مؤثر ۵۰ درصد (EC_{50}) توکسین‌های سویه‌های AzLp، IE-2 و IP-2، در برابر سلول‌های Sf21.

Bt strains	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	95% confidence Interval	Slope \pm SE
AzLp	1.89	1.50-2.36	-1.67 \pm 0.22
IE-2	1.03	0.84-1.27	-1.53 \pm 0.18
IP-2	1.60	1.14-2.23	-1.46 \pm 0.24

نتایج مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد، پس از آنکه سلول های Sf21، به مدت سه ساعت در معرض غلظت میانی توکسین (۱۶ $\mu\text{g/ml}$) قرار گرفتند، سلول هایی که دچار تورم اسمزی شدند و بادکنکی شکل هستند، ظاهر گشتند. زمانی که سلول ها در معرض بالاترین غلظت توکسین، ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ، قرار گرفتند، تخریب کامل سلول ها، مشاهده و ثبت گردید (شکل ۲-۷).



شکل ۲-۷ - سلول های Sf21 تیمار شده با توکسین فعال شده سویه های AzLp، IE-2 و IP-2. تغییرات ریخت شناختی، سه ساعت پس از آنکه سلول ها در معرض توکسین، در سه غلظت ۱۶، ۰/۶۴، و ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ قرار گرفتند، ثبت گردیده است. پیکان های سفید رنگ، به سلول های متورم و بادکنکی شکل اشاره می کند. پیکان های سیاه رنگ، سلول های تخریب شده را نشان می دهد. مقیاس موجود در تصویر، معادل ۵۰ میکرومتر می باشد.

به منظور گسترش دامنه ای اطلاعات به دست آمده از سویه های ایرانی باکتری Bt، فعالیت سلول کشی آن ها نیز در برابر چهار رده ی سلولی از آفات بال پولکدار، آزمون گردید. لازم به ذکر است که، پاسخ رده های سلولی به توکسین های متفاوت باکتری Bt، لزوماً مشابه واکنش زنده ی لاروی که رده ی سلولی از آن مشتق شده است، نیست (Witt et al., 1986). برای بررسی این ادعا، نتایج زیست سنجی لاروهای *S. exigua* و آزمون زنده مانگی سلول های UCR-SE، با هم مقایسه شدند. نتایج حاکی از آن بود که، فعالیت سلول کشی سویه های باکتری Bt،

با نتایج زیست‌سنجی روی لارو آفت تطابق کامل دارد. به طوری که، سه سویه ی AzLp، IE-2 و IP-2، بیشترین زهرآگینی را برای لاروهای سن یک *S. exigua* داشتند، حال آنکه فعالیت متابولیکی سلول‌های UCR-SE (برگرفته از *S. exigua*) تیمار شده با توکسین فعال شده‌ی این سه سویه Bt، نیز به شدت کاهش یافت. بنابراین، استفاده از رده‌های سلولی حشرات، در مطالعات پایش زهرآگینی سویه‌های باکتری Bt، روشی سریع، قابل اعتماد و دقیق می‌باشد.

نتایج آزمون‌های زنده‌مانی سلول نشان داد که، پروتئین‌های سه سویه ی AzLp، IE-2 و IP-2، بیشترین زهرآگینی را روی سلول‌های *H. zea*، *T. ni*، *S. exigua* و *S. frugiperda* داشتند. این نتایج با پژوهش‌های پیشین (Kwa et al., 1998; Gringorten et al., 1999)، کاملاً مطابقت دارد که حساسیت زیاد رده‌های سلولی Sf21 و Hi5 را نسبت به توکسین Cry1C، نشان داده بودند. رده‌های سلولی Sf21، UCR-SE، Hi5 و HzGUT نسبت به سویه‌های تولید کننده‌ی توکسین Cry1Ac؛ IE-1 و RM، حساسیت نداشتند. در گزارش‌های دیگر (Gringorten et al., 1999; Chen et al., 2015) نیز به عدم بروز حساسیت در سلول‌های Sf9، Sf21 و Hi5 نسبت به توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ab و Cry1Ac، اشاره شده است.

۲-۳-۸- بررسی تولید بتا اگزوتوکسین

به‌عنوان آخرین مرحله از مراحل تعیین ویژگی‌های سویه‌های ایرانی باکتری Bt، وجود یا عدم وجود بتا اگزوتوکسین، به روش LC-MS/MS تعیین گشت. در این آزمون از بتا اگزوتوکسین (نوع یک) استاندارد از سویه *B. thuringiensis* HD-2 (Berliner) *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 و دو سویه ی HD-2 و *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* VMA10.30 به‌عنوان شاهد‌های مثبت، و برای شاهد منفی از سویه HD-1 استفاده گردید. نتایج حاکی از آن بود که، هیچ یک از هفت سویه‌ی مورد مطالعه، همانند شاهد منفی (HD1)، بتا-اگزوتوکسین تولید نمی‌کنند (جدول ۲-۱۳). تعیین تولید یا عدم تولید بتا-اگزوتوکسین، مرحله‌ای اساسی و ضروری، پیش از معرفی یک سویه از باکتری Bt برای تجاری‌سازی، می‌باشد.

جدول ۲-۱۳- بررسی تولید بتا-اگزوتوکسین در سویه های باکتری Bt.

Sample type	Sample text	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Standard β -exotoxin	12.5 $\mu\text{g/ml}$	13.8707
	25 $\mu\text{g/ml}$	23.2155
	50 $\mu\text{g/ml}$	45.7588
	100 $\mu\text{g/ml}$	104.6550
Negative control	HD-1	0
Positive control	HD-2	19.7885
	VMA10.30	15.8343
Bt strains	IE-1	0
	AzLp	0
	IE-2	0
	IP-2	0
	IEp	0
	RM	0
	KhF	0

به طور خلاصه، نتیجه ی کلی که از بخش اول این رساله حاصل می گردد، بدین شرح می باشد؛ برای پیش گویی پتانسیل حشره کشی سویه های جدید باکتری Bt، در کنار روش های مبتنی بر واکنش های زنجیره ای پلی مرز، تعیین محتوای پروتئینی کریستال ها به روش LC-MS/MS، روشی بسیار کاربردی می باشد. اما، انجام آزمون های زیست سنجی (با حشرات یا با رده های سلولی)، مرحله ای بسیار ضروری و غیر قابل اجتناب برای تکمیل ویژگی های حشره کشی سویه های جدید، می باشند. به این دلیل که، فراوانی نسبی پروتئین های حشره کش موجود در کریستال هر جدایه و از همه مهم تر برهم کنشی که بین توکسین های مختلف با پروتئازها و گیرنده های میزبان وجود دارد، نقشی تعیین کننده در شدت بیماری زای و فعالیت سویه Bt مورد بررسی، دارد.

بنابراین، در این رساله سه سویه ی AzLp، IE-2 و IP-2، به دلیل زهر آگینی زیاد علیه لاروها و رده های سلولی آفات بال پولکدار، وجود پروتئین های حشره کش Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry1Ca و Cry1Da، و عدم وجود بتا-اگزوتوکسین، به عنوان کاندیدهای مناسبی برای تولید حشره کش های زیستی بر پایه ی Bt، معرفی شدند.

در فصل دوم این رساله برای شناسایی، تعیین ویژگی و پیش‌گویی پتانسیل حشره‌کشی سویه‌های جدید باکتری Bt، روش‌های مختلف و مکمل بهره‌جسته شد که متعاقباً اطلاعات جامعی از سویه‌های Bt حاصل آمد. اما این سؤال مطرح شد که؛ آیا در بین سویه‌های Bt تازه شناسایی شده‌ی بومی ایران، با توجه به مطالعات گسترده‌ای که در محتوای ژنی و ترکیب پروتئین‌های کریستال صورت گرفته است، می‌توان توکسین جدید و منحصر به فردی یافت؟ پاسخ این سؤال در فصل بعدی ارائه شده است.

فصل سوم

ردیابی و همسانه‌سازی ژن جدید احتمالی در سویه‌های
ایرانی باکتری Bt

فصل سوم: ردیابی و همسانه‌سازی ژن جدید احتمالی در سویه‌های ایرانی Bt

۳-۱- مقدمه

به دلیل استفاده‌ی بی‌رویه از آفت‌کش‌های زیستی بر پایه‌ی Bt مقاومت در تعدادی از حشرات آفت گزارش شده است (Ferré et al., 1991). راهکارهای متفاوتی برای افزایش کارایی محصولات Bt در نظر گرفته شده است. برای به حداکثر رساندن اثر آفت‌کش‌های زیستی بر پایه‌ی Bt و همچنین برای غلبه بر مقاومت و یا حداقل به تأخیر انداختن بروز مقاومت، استفاده از چند توکسین متفاوت از باکتری Bt (در صورت امکان با نحوه‌ی اثر متفاوت) در گیاهان تراریخت و یا در محصولات Bt، راهکاری مناسب به نظر می‌رسد. تاکنون ژن‌های زیادی از باکتری Bt، شناسایی، همسانه‌سازی و فعالیت حشره‌کشی آن‌ها بررسی شده است. در این فصل از رساله، ابتدا بر اساس نتایج به دست آمده در شناسایی محتوای پروتئینی کریستال‌ها و تعیین محتوای ژنی سویه‌های باکتری Bt، ژن‌های مناسب برای همسانه‌سازی تعیین گردید. سپس، روی شناسایی و همسانه‌سازی ژن *cryII* با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد پروتئین‌های CryII، تمرکز شده است.

تعداد زیادی پروتئین CryII، تاکنون شناسایی و توصیف شده است، و فعالیت حشره‌کشی آن‌ها علیه آفات حساس احتمالی، از دو راسته‌ی بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان، ارزیابی شده است، که از آن جمله می‌توان به: *Spodoptera* spp., *Manduca sexta*, *Cydia pomonella*, *Agrotis ipsilon*, *Earias insulana*, *Plutella xylostella*, *Prays olea*, *Telchi licus licus*, *Bombyx mori*, *H. armigera*, *T. ni*, *Ostrinia* spp., *H. zea*, *Pyrrhalta aenescens*, *Leguminivora glycinivorella*, *Epiphyas*, *postvittana*, *Artogeia rapae*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Anthonomus grandis* و *Tenebrio molitor* اشاره کرد (Tailor et al., 1992; Koo et al., 1995; 1998; Choi et al., 2000; Tounsi et al., 2003; Song et al., 2003; Boncheva et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2006; Martins et al., 2007; Grossi-de-Sa et al., 2007; Guo et al., 2009; Dammak et al., 2010; Craveiro et al., 2010; Dammak et al., 2011; Guo et al., 2011; Bergamasco et al., 2013; Zhao et al., 2015; Shin et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018).

برای اولین بار Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۲، دلتا-اندوتوکسین جدیدی از باکتری Bt، پیدا کردند که ویژگی‌های منحصر به فردی از لحاظ اندازه پیش‌توکسین، ساختار و دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی داشت. ژن تازه یافت شده *cryV*، نام گرفت و همسانسازی شد. نتایج زیست‌سنجی با محصول این ژن، نشان داد که پروتئین CryV برای *O. nubilalis* و *L. decemlineata*، زهرآگین می‌باشد.

در سال ۲۰۰۰، Choi و همکاران، ژن *cryIIId1* را همسانسازی کردند. توالی اسیدهای آمینه‌ی پروتئین حاصل از این ژن، با پروتئین‌های CryIIa، CryIIb و CryIIc، به ترتیب ۸۹/۷، ۸۷/۲ و ۸۳/۴ درصد شباهت نشان داد. توکسین CryIIId1 برای لاروهای *P. xylostella* زهرآگین بود، اما فعالیت حشره‌کشی چشم‌گیری روی لاروهای *B. mori* و *Agelastica coerulea* نداشت.

ژن ۱۵۴۸ جفت‌بازی *cryIIe1* همسانسازی و در سلول‌های *Escherichia coli* BL21 (DE3) بیان گردید. اثر پروتئین نو ترکیب به دست آمده روی آفات مختلفی از دو راسته‌ی بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، پروتئین CryIIe1 برای *O. furnacalis*، *P. xylostella* و *L. glycinivorella* زهرآگین بوده، حال آن‌که فعالیت حشره‌کشی برای *H. armigera*، *S. exigua* و *P. aenescens* نداشت است (Song et al., 2003).

اثر پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی نه پروتئین فعال برای آفات بال‌پولکدار؛ Cry1Ab، Cry1Aa، Cry1Ac، Cry1Ba، Cry1Ca، Cry1Cb، Cry1Da، Cry1Fa و Cry1Ia، روی لاروهای *C. pomonella* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که، تفاوت معنی‌دار بین زهرآگینی پیش‌توکسین و توکسین فعال پروتئین Cry1Ia، وجود نداشت است، اما برای سایر پروتئین‌های مورد بررسی شدت بیماری‌زایی توکسین فعال شده، حداقل ۳ الی ۴ برابر بیشتر از پیش‌توکسین بوده است. همچنین، Cry1Ia کمترین زهرآگینی را برای آفت هدف مورد مطالعه داشته است (Boncheva et al., 2006).

ژن ۲/۲ کیلو جفت‌بازی *cryIIa7*، همسانسازی شده که وزن مولکولی پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی حاصل از آن، به ترتیب برابر با ۸۰/۹ و ۶۰ کیلودالتون بوده است. دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia7، در برابر آفاتی از خانواده‌های Noctuidae، Tortricidae، Plutellidae و Chrysomelidae، مورد

بررسى قرار گرفت. بر اساس نتايج به دست آمده، پروتئين Cry1Ia7 براى آفاتى از جمله، *P. L. botrana*، Cry1Ia7، عدم رقابت با توکسين هاى Cry1Ab و Cry1Ac، براى اتصال به گیرنده هاى موجود در سطح سلول هاى پوششى روده ي ميانى *L. botrana* و *E. insulana*، بوده است (Ruiz de Escudero et al., 2006).

ژن *cryIIa12* از سويه ي Bt S811 جدا و همسانه سازى شده است. اين ژن ۲۱۶۰ جفت باز طول دارد و پروتئينى به طول ۷۱۹ اسيد آمينه، با وزن ۸۱ كيلودالتون را رمز مى كند. توالى اسيد هاى آمينه ي پروتئين Cry1Ia12، با ساير پروتئين هاى شناخته شده ي Cry1Ia، ۹۹ درصد شباهت دارد. زهر آگينى پروتئين Cry1Ia12 عليه مهم ترين آفات پنبه؛ *S. frugiperda* و *A. grandis*، آزمون گرديد. نتايج زيست سنجى نشان داد كه، پروتئين نوتركيب زهر آگينى متوسط عليه آفات آزمون شده، دارد (Grossi-de-Sa et al., 2007).

فعاليت حشره كشى پيش توکسين، توکسين فعال شده (منومر) و اليگومر هاى Cry1Ie، روى لارو هاى *P. xylostella* مورد بررسى قرار گرفت. بر اساس نتايج زيست سنجى، LC₅₀ هاى به دست آمده به ترتيب براى پيش توکسين، منومر و اليگومر پروتئين، ۱۴، ۲۱ و ۱۴۰۰ ميكروگرم به ميلى ليتر، بودند. در نتيجه، پيش توکسين Cry1Ie، بيشترين زهر آگينى را برى لارو هاى *P. xylostella* داشته است (Guo et al., 2009).

دو توکسين Cry1Ia11 و Cry1Aa11، ار منظر فعاليت حشره كشى روى لارو هاى *Prays oleae*، روش انحلال پيش توکسين، فعال سازى پيش توکسين با استفاده از آنزيم هاى تريپسين و کيموترىپسين و هم چنين تحت تاثير عصاره ي روده ي ميانى، مورد بررسى قرار گرفتند. بر اساس نتايج به دست آمده، LC₅₀ توکسين Cry1Ia11، به طور معنى دارى بيشتر، بوده و اين دو پروتئين از نظر نحوه ي اثر با هم متفاوت بودند (Damak et al., 2010).

فعاليت حشره كشى و نحوه ي اثر توکسين Cry1Ia10، به تنهائى و مخلوط با توکسين Vip3Aa، روى لارو هاى سن يك *S. frugiperda*، *S. albula*، *S. eridania* و *S. cosmioides*، مورد بررسى قرار گرفت. هم چنين، برهم کنش اين دو توکسين با قطعاتى از سلول هاى پوششى روده ي ميانى حشرات نام برده شده، مطالعه

گردید. نتایج حاکی از آن بود که دو توکسین Cry1Ia10 و Vip3Aa، برای گیرنده های یکسانی در سلول های پوششی، رقابت نمی کنند و جایگاه اثر متفاوتی دارند. نتایج زیست سنجی نشان داد که، توکسین Cry1Ia10، زهرآگینی کمتری برای *S. frugiperda*، *S. albula* و *S. cosmioides*، نسبت به توکسین Vip3Aa، داشتند اما، استفاده ی هم زمان دو توکسین، اثر سینرژیستی بر شدت بیماری زایی روی *S. frugiperda*، *S. albula* و *S. cosmioides*، داشته است (Bergamasco et al., 2013).

حساسیت لاروهای *H. armigera* به ذرت تراریخت با توکسین Cry1Ie و Cry1Ab، بررسی و با هم مقایسه گردید. گیاه ذرت تراریخت شده با توکسین Cry1Ie، به شدت برای لاروهای *H. armigera* و *O. furnacalis* زهرآگین بودند، به طوری که بعد از گذشت شش روز، ۵۰ درصد جمعیت لاروهای تغذیه کرده از این ذرت از بین رفتند. گرچه ذرت های تراریخت با توکسین های Cry1Ab و Cry1Ac، نسبت به توکسین Cry1Ie، زهرآگینی بیشتری برای لاروهای *H. armigera* داشتند اما، شدت بیماری زایی کمتری در حشرات مقاوم به توکسین Cry1Ac، مشاهده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، پروتئین Cry1Ie، نحوه ی اثر متفاوتی نسبت به پروتئین های Cry1Ab و Cry1Ac، دارد. در نتیجه، ذرت های تراریخت شده با توکسین Cry1Ie، می تواند بروز مقاومت را در حشرات مزرعه، به تعویق بیندازند (Zhang et al., 2013).

امکان استفاده ی هم زمان توکسین Cry1Ie2 با دو پروتئین Cry1Ab و Cry1Fa، برای کنترل لاروهای *Ostrinia spp.*، مورد بررسی قرار گرفت. پیش توکسن و توکسین فعال شده ی Cry1Ie2، به ترتیب ۸۱ و ۵۵ کیلودالتون، وزن دارند. بر اساس نتایج، پیش توکسین Cry1Ie2، زهرآگینی زیادی برای لاروهای *O. furnacalis* و *O. nubilalis*، دارد. هم چنین نتایج پژوهش Zhao و همکاران (۲۰۱۵)، امکان استفاده ی هم زمان دو توکسین Cry1Ie2 و Cry1Ab را برای کنترل لاروهای *Ostrinia spp.* نشان داده است. زیرا، دو پروتئین مذکور جایگاه های اتصال متفاوتی دارند، در نتیجه برای اتصال به گیرنده های موجود در سلول های پوششی روده ی میانی حشره ی آفت، با هم رقابت نمی کنند.

بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش Oliveira و همکاران (۲۰۱۶)، پنبه تراریخت شده با توکسین Cry1Ia12، بیش از ۴۰ درصد باعث مرگ لاروهای *S. frugiperda* شده است و دوره ی نمو این حشرات، تا

۳۰ برابر بيشتراز حشراتى شده كه از پنبه غير تراريخت، تغذيه كرده‌اند. هم‌چنين، جمعيت *A. grandis* تا ۶۰ درصد كنترل شده است. لاروها و حشرات بالغ *A. grandis* روى پنبه تراريخت، به‌طور معنى‌دارى كوچك‌تر و ضعيف‌تر از حشراتى هستند كه، از پنبه‌ى معمولى تغذيه كرده‌اند. بر اساس نتايج به دست آمده در اين پژوهش، توكسين CryIIa12، باعث كنترل هر دو آفت *S. frugiperda* و *A. grandis* مى‌شود.

فرضيه مورد بررسى در اين فصل از رساله بدین قرار تعيين گشت؛ احتمال يافتن توكسين جديد و منحصر به فردى از نقطه نظر دامنه‌ى ميزبانى و نحوه‌ى اثر در بين سويه‌هاى ايرانى باكتري Bt وجود دارد.

۳-۲- مواد و روش‌ها

۳-۲-۱- يافتن ژن كانديد براى همسانه‌سازى

در اين بخش از رساله، هدف همسانه‌سازى ژنى جديد و بررسى اثر پروتئين حاصل از آن ژن، روى لارو و سلول‌هاى آفات بال‌پولكدار بود. بدین منظور، ابتدا روى نتايج مطالعات پروتئوميكس تمرکز شد و از ميان پروتئين‌هاى شناسايى شده، موارد جديد كه تاكنون روى فعاليت حشره‌كشى آن‌ها پژوهشى صورت نگرفته بوده، انتخاب و فهرستى از ژن‌هاى كانديد تهيه گشت. ژن‌هاى مربوط به پروتئين‌هاى شناسايى شده‌ى جديد، با انجام PCR مورد بررسى قرار گرفتند. قطعات تكثير شده، تعيين توالى شدند و نتيجه توالى در پايگاه اطلاعاتى NCBI مورد بررسى قرار گرفت. اما، اين نکته را بايد در نظر داشت كه، تمامى ژن‌هاى حشره‌كش باكتري Bt بيان نمى‌شوند، در نتيجه اطلاعات مربوط به پروتئين حاصل از آن ژن‌ها را در نتايج پروتئوميكس نخواهيم داشت. در نتيجه، با توجه به پروفایل پروتئينى و دامنه‌ى فعاليت حشره‌كشى سويه‌هاى باكتري Bt، با كمك واكنش‌هاى زنجيره‌اى پلى‌مراز، احتمال حضور برخى از ژن‌هاى حشره‌كش نيز بررسى شد.

فهرست تهيه شده از پروتئين‌هاى جديد بر اساس گزارش‌هاى LC/MS-MS و نتايج PCR، كه تاكنون

تحقيقى روى آن‌ها صورت نگرفته بود، شامل؛ *Cry1Ag*، *Cry1Ha*، *Cry1Hb*، *Cry1G*، *Cry1Ad* و *Cry1Ia*

بودند.

۳-۲-۲- ژن *cryIAg*

طبق نتایج پروتئومیکس، در سویه *ΔE-1* پروتئین *CryIAg* وجود دارد و بر اساس مرور منابع، تاکنون فعالیت حشره کشی این پروتئین مورد بررسی قرار نگرفته است. فهرستی از تمام پپتیدهای شناسایی شده ی این پروتئین با حدود اطمینان بالای ۹۵ درصد تهیه شد، این فهرست شامل ۴۹۱ توالی پپتیدی با طول بیش از شش اسیدآمین، منحصر به فرد و بدون تکرار می باشد. توالی پپتیدهای به دست آمده با توالی های نوکلئوتیدی و پپتیدی موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم افزارهای به ترتیب PBLAST و tBLASTn مقایسه شدند. نتایج مقایسات هم ترازوی توالی های نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای حاکی از آن بود که، قطعات پپتیدی مورد بررسی مربوط به پروتئین *CryIAg* با شماره دستیابی Q9S515.1 می باشد و بیشترین تطابق را با ژن *cryIAg* با شماره دستیابی AF081248.1 دارد. سپس، بعد از حصول توالی نوکلئوتیدی کامل ژن *cryIAg* با شماره دستیابی AF081248.1، آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این ژن طراحی شدند. ژن *cryIAg* ۳۸۵۹ جفت باز دارد و CDS^۱ این ژن از نوکلئوتید شماره ۱۵۹ تا ۳۶۵۹ می باشد. از رمز شدن این ژن، پروتئینی با اندازه ۱۱۶۶ اسیدآمین به دست می آید. برای تکثیر کامل این ژن، چهار جفت آغازگری که هم پوشانی دارند، مطابق آنچه پیشتر توضیح داده شده است، طراحی شد.

قطعات تکثیر شده در PCR بعد از حذف قطعات غیر هدف و اجزای باقی مانده واکنش، با استفاده از کیت *NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit*، برای تعیین توالی به شرکت *StabVida* ارسال شد. اما هیچ قطعه ای برای بخش اول ژن، با اولین جفت آغازگر تکثیر نشده بود. در نتیجه، با استفاده از تکنیک ژنگان پیمایی^۲، توالی نوکلئوتیدی قسمت ابتدایی ژن *cryIAg* که توسط آغازگرهای طراحی شده تکثیر نشده بود، مشخص شد. راه ژنگان پیمایی (*Genome walking* یا *DNA walking*)، روشی ساده برای یافتن توالی ناشناخته از دی.ان.ای ژنومی است که درست در کنار توالی شناخته شده ای قرار دارد. به این ترتیب با استفاده از بخشی از ژن که توالی آن مشخص است، توالی قسمتی از دی.ان.ای یا ژن که ناشناخته یا تکثیر نیافته است، مشخص می شود. به طور خلاصه و همان طور که در شکل شماره ۳-۱، آمده است، روش انجام کار، بدین شرح است: برای شروع، نیاز به

^۱ Coding Sequence

^۲ Genome Walking

دی.ان.ای ژنومی با کیفیت، خلوص و غلظت زیاد بود. سهم‌های^۱ متفاوتی از دی.ان.ای تهیه و هر کدام به طور کامل با استفاده از آنزیم‌های برشی^۲ مختلف که انتهای صاف^۳ ایجاد می‌کنند، هضم شدند. سپس به دو انتهای قطعات دی.ان.ای ژنومی هضم شده، به طور جداگانه آداپتور^۴ متصل گردید. به این قطعات ژنومی متصل به آداپتور اصطلاحاً کتابخانه‌های ژنومی می‌گویند. بعد از ساخت این کتابخانه‌های ژنومی نیاز به انجام دو PCR آشیانه‌ای بود (nested PCR)، به این ترتیب که PCR دوم با استفاده از محصول PCR اول انجام می‌شود. برای انجام این PCRها تنها به دو عدد آغازگر نیاز هست که با توجه به اینکه توالی upstream یا downstream قطعه مورد نظر نیاز است، آغازگرهای به ترتیب معکوس و یا پیش‌رو طراحی می‌شود. جفت آغازگر دیگر، بر اساس توالی آداپتورهای که به انتهای صاف قطعات دی.ان.ای ژنومی متصل شده است، طراحی می‌گردد. در اولین PCR، از یک آغازگر اختصاصی شماره یک^۵ (GSP1) و در دومین PCR از آغازگر اختصاصی شماره دو^۶ (GSP2) استفاده شد. با توجه به اینکه نواحی بالادست ژن *cryIAg* ناشناخته است، آغازگر GSP2 به قسمت ناشناخته ژن نزدیک‌تر است و آغازگر GSP1 نسبت به بخش ناشناخته در فاصله دورتری قرار دارد. محصول PCR اولیه که با آغازگر GSP1 انجام شد، برای انجام PCR دوم با آغازگر GSP2 مورد استفاده قرار گرفت. سپس محصولات PCR دوم تعیین توالی شدند و توالی بخش ناشناخته ژن *cryIAg* به دست آمد.

¹ Aliquot

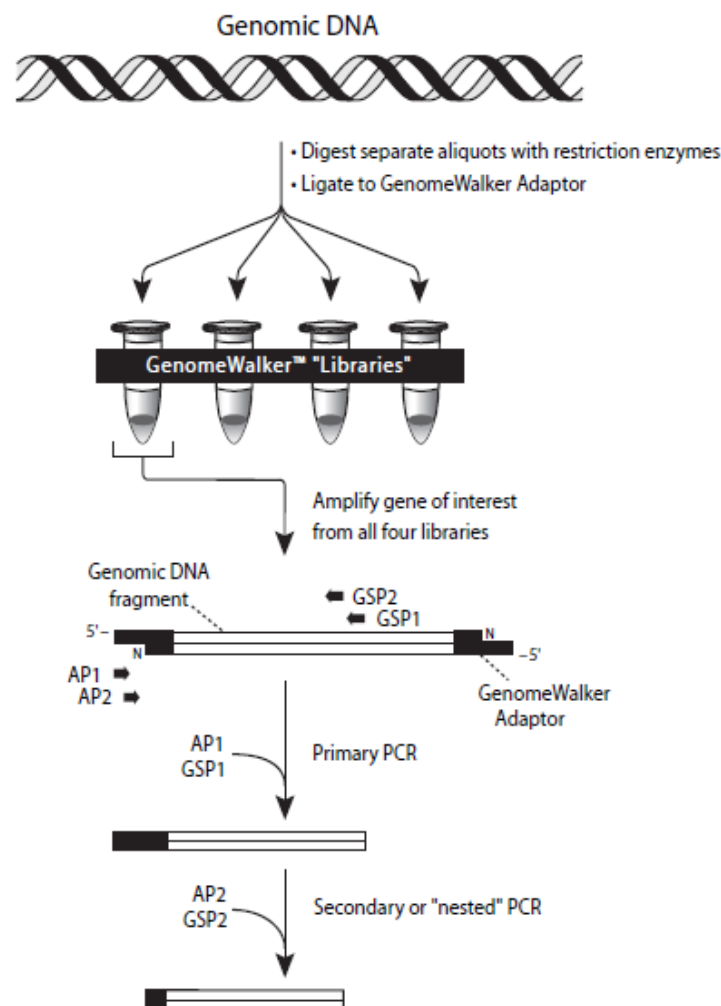
² Restriction Enzyme

³ Blunt End

⁴ Adaptor

⁵ Gene Specific Primer 1

⁶ Gene Specific Primer 2



شکل ۳-۱- مراحل انجام ژنگان پیمایی؛ استخراج دی.ان.ای ژنومی مورد نظر، هضم دی.ان.ای با استفاده از آنزیم های برشی، اتصال آداپتور به قطعات دی.ان.ای ژنومی با انتهای صاف، تکثیر ژن مورد نظر در تمامی کتابخانه های ژنومی تهیه شده.

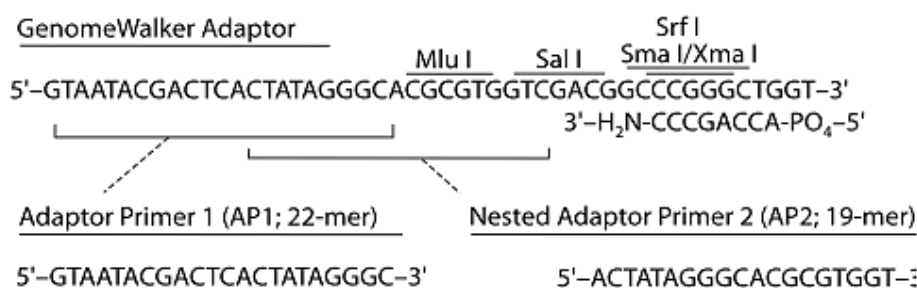
با توجه به توضیح داده شده، در قدم اول نیاز بود تا دی.ان.ای ژنومی سویه IE-1 استخراج شود. برای استخراج دی.ان.ای از کیت (Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (Hilden, Germany) طبق دستور شرکت سازنده، استفاده شد. سپس، کمیت و کیفیت دی.ان.ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تمامیت یا یکپارچگی^۱ دی.ان.ای استخراج شده، یک میکرولیتر از دی.ان.ای

¹ Integrity

استخراج شده به همراه چهار میکرولیتر از بافر نمونه در هر چاهک ژل اتیدیوم بروماید-آگارز یک درصد بارگذاری شد. خلوص دی.ان.ای استخراج شده، با استفاده از آنزیم برشی DraI مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم ردیف شناسایی شش نوکلئوتیدی TTTAAA دارد و انتهای صاف ایجاد می کند. به این ترتیب که، در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتری، پنج میکرولیتر از دی.ان.ای مورد نظر با غلظت ۰/۱، ۱/۶ میکرولیتر از آنزیم برشی DraI (10 units/μl)، دو میکرولیتر از بافر 10X آنزیم DraI و ۱۱/۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، اضافه گردید. در مورد شاهد منفی، به جای آنزیم از آب مقطر استریل استفاده شد. میکروتیوب ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پنج میکرولیتر از مخلوط واکنش در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. در این مرحله انتظار می رفت که دی.ان.ای استخراج شده توسط آنزیم برشی DraI هضم و smear دیده شود. در مرحله ی بعد از چهار آنزیم برشی DraI، EcoR V، PvuII و StuI، که انتهای صاف ایجاد می کنند برای ساخت چهار کتابخانه ژنومی استفاده گردید.

برای ساخت کتابخانه های ژنومی، به هر آنزیم یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری اختصاص داده شد و به آن ۲۵ میکرولیتر از دی.ان.ای استخراج شده با غلظت ۰/۱، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم برشی مورد نظر با غلظت (10 units/μl)، ده میکرولیتر بافر 10X آنزیم برشی و ۵۷ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گشت. میکروتیوب ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه و سپس پنج میکرولیتر از هر کتابخانه در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد تا هضم آنزیمی دی.ان.ای مورد بررسی قرار گیرد. انتظار می رفت که در هر هضم smear دید شود به این مفهوم که آنزیم در جایگاه های مختلفی دی.ان.ای را برش داده است. پس از هضم آنزیمی، دی.ان.ای حاصل به روش فنول-کلروفرم خالص شد. به این صورت که به هر میکروتیوب، ۹۵ میکرولیتر فنول اضافه و میکروتیوب ها با سرعت بسیار کم بین ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. بعد از تشکیل دو فاز آبی و آلی، فاز آبی (لایه رویی) با دقت به میکروتیوب تمیزی انتقال یافت. سپس به هر میکروتیوب ۹۵ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید، میکروتیوب ها با سرعت بسیار کم بین ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. بعد از تشکیل دو فاز آبی و آلی، فاز آبی (لایه رویی) با دقت به میکروتیوب تمیزی منتقل گردید. سپس ۱۹۰ میکرولیتر اتانول سرد ۹۵ درصد، ۹/۵ میکرولیتر NaOAc سه مولار و ۲۰ میکروگرم گلیکوژن به هر تیوب اضافه گشت، میکروتیوب ها با سرعت بسیار کم بین ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با ۱۴۰۰۰ دور

در دقیقه انجام گرفت. روشن شدن دور ریخته شد و ته نشین در ۲۰ میکرولیتر از بافر TE (10/0.1, pH 7.5) حل گردید و سپس میکروتیوبها با سرعت بسیار کم بین ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. کیفیت و کمیت یک میکرولیتر از هر کتابخانه ژنومی، به ترتیب در ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین گشت. برای انجام تکنیک راه ژنگان پیمایی از کیت Genome Walking Universal Kit (Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company, California, USA) استفاده شد. به انتهای صاف قطعات ژنی موجود در هر کتابخانه، آداپتورهای این کیت، همان طور که در شکل ۳-۲ آمده است، متصل گشت. برای جلوگیری از تشکیل ساختارهای ثانویه و سنجاق سری، نیاز بود تا آداپتور به بلاکر^۱ متصل شود. آداپتور و بلاکر با نسبت ۱:۱ با هم مخلوط و برای تشکیل دی.ان.ای دو رشته ای، مخلوط حاصل به مدت یک دقیقه در دمای ۹۹ درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل ۳-۲- توالی آداپتور و بلاکر مورد استفاده برای ژنگان پیمایی.

در مرحله بعد، برای اتصال آداپتور به قطعات ژنی، به هر کتابخانه یک میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتری اختصاص داده و به آن ۶/۵ میکرولیتر دی.ان.ای هضم و خالص شده، ده میکروایتر آداپتور با غلظت ۲۵ μM، ۰/۵ میکرولیتر از دی.ان.ای لیگاز T4 (Thermo scientific EL0014) با غلظت پنج واحد در هر میکرولیتر و یک میکرولیتر از بافر اتصال 10X^۲، اضافه شد. میکروتیوبها یک شب در دمای ۱۶ درجه سلسیوس انکوبه شدند. برای پایان دادن به واکنش، میکروتیوبها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و به هر تیوب ۷۲ میکرولیتر از بافر TE (10/1, pH 7.5) اضافه گردید و میکروتیوبها با سرعت بسیار کم بین ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شدند.

¹ Blocker

² Ligation Buffer

به دو عدد آغازگر اختصاصی ژن *cryIAg* با نام‌های GSP1 و GSP2 به ترتیب برای اولین و دومین PCR نیاز بود. در طراحی آغازگر برای تکنیک راه ژنگان پیمایی، شرایط خاصی رعایت شد:

- طول این آغازگرها باید بین ۲۶ تا ۳۰ عدد نوکلئوتید، در شرایط بهینه ۲۷ نوکلئوتید می‌بود،
 - ملاحظه‌ی ۴۰ تا ۶۰ درصدی محتوای GC آغازگرها حتی اگر دمای ذوب خیلی بالا می‌رفت،
 - عدم تشکیل ساختار ثانویه با توجه به تعداد زیاد نوکلئوتیدها،
 - رعایت نچسبیدن انتهای ۳' پرایمر به انتهای ۳' آداپتور،
 - لحاظ دمای ۶۷ درجه سلسیوس به‌عنوان دمای اتصال پرایمرها به رشته الگو.
 - در شش نوکلئوتید موجود در انتهای ۳' پرایمر نباید بیشتر از سه گوانین و سه سیتوزین وجود می‌داشت.
- با در نظر گرفتن این شرایط، دو عدد آغازگر اختصاصی معکوس طراحی شد. با توجه به این که در مورد ژن *cryIAg* قسمت ابتدایی ژن ناشناخته بود باید به سمت بالادست ژن حرکت می‌شد، در نتیجه آغازگر آداپتور^۱ (AP1 و AP2)، به‌عنوان آغازگر پیش‌رو و آغازگرهای طراحی شده، به‌عنوان آغازگر معکوس مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش برای انجام اولین PCR به شرح جدول ۳-۱ تهیه گردید. برای تکثیر نواحی ژنی مورد نیاز از آنزیم (KAPA HiFi hot start (KAPA Biosystems, Basel, Switzerland) *taq* استفاده شد.

جدول ۳-۱ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در اولین PCR راه ژنگان پیمایی.

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	10	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/μl	1	0.02 U/μl
dNTPs mix	10 mM	4	0.8 mM
Adaptor primer (forward)	10 μM	1	0.2 μM
GSP1 primer (reverse)	10 μM	1	0.2 μM
Template DNA	100 ng/μl	2	4 ng/μl
Sterile bidistilled water		31	
Total volume		50	

¹ Adaptor Primer 1 And Adaptor Primer 2

نوع PCR مورد استفاده برای تکنیک راه ژنگان پیمایی touchdown PCR نامیده می‌شود که در دو مرحله انجام شد. به این مفهوم که PCR با دمای بالای اتصال شروع شد و بعد در هر مرحله دما کاهش یافت تا از اتصال‌های غیر اختصاصی جلوگیری شود. شرایط اولین PCR به شرح جدول ۳-۲ بود. محصولات حاصل از اولین PCR روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شدند.

جدول ۳-۲- برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز راه ژنگان پیمایی.

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	70 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	63	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

در PCR دوم انتظار می‌رفت باندهایی با اندازه کوچک‌تر نسبت به PCR اول دیده شود به این مفهوم که بخش ناشناخته ژن که در حد فاصله بین GSP2 تا AP2 هست، تکثیر شود و چون همان طور که گفته شد GSP1 نسبت به GSP2 در فاصله‌ی نزدیک‌تری نسبت به قسمت شناخته نشده ژن قرار دارد. تهیه مخلوط واکنش برای دومین PCR، مانند PCR اول تهیه شد با این تفاوت که به جای کتابخانه‌ی ژنی (دی.ان.ای الگو)، از دو میکرولیتر از محصولات PCR اولیه که به نسبت ۱:۵۰ رقیق شده بودند، استفاده شد. محصولات اولین و دومین PCR توالی‌یابی شدند. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار Geneious (version 10.0.9) ویرایش و توالی اجماع حاصل گردید. نتیجه هم‌ترازی توالی اجماع به دست آمده، نشان داد که قطعه ژن تکثیر شده، مربوط به ژن *cryIAa* می‌باشد نه ژن *cryIAG*. در نتیجه، به نظر رسید که در محصولات PCR تکثیر ژن *cryIAG*، دو ژن *cryIAa1* و *cryIAG1* به طور هم‌زمان تکثیر شده‌اند، پس برش محصولات PCR با استفاده از آنزیم‌های

برشی اختصاصی برای هر ژن، حضور هر کدام از این ژن ها را اثبات کرد. بنابراین ابتدا با توجه به وب سایت نام گذاری توکسین های باکتری Bt، (<http://www.btnomenclature.info>), شماره دستیابی هر یک از این ژن ها، حاصل و توالی نوکلئوتیدی آن ژن در پایگاه NCBI، جست و جو شد. فهرستی از آنزیم های برشی هر یک از این ژن ها با استفاده از نرم افزار Clone Manager به دست آمد. سپس، با توجه به اینکه، جایگاه برش این آنزیم ها، در محدوده ی مناسبی از محصولات PCR قرار بگیرند، به این مفهوم که، باندهای حاصل از برش قطعه، روی ژل قابل رؤیت باشند، فهرستی از آنزیم برشی اختصاصی برای هر ژن تهیه شد (جدول ۳-۳). آنزیم های برشی انتخابی، برای ژن *cryIAa1*، آنزیم SacI و برای ژن *cryIAG1*، آنزیم SmaI بود. آنزیم SacI، ژن *cryIAa1* را در نوکلئوتید ۱۸۶۹ برش می دهد که جایگاه این نوکلئوتید مطابق با نوکلئوتید شماره ۱۳۹۲ در توالی اجماع سویه IE-1 است، پس اگر ژن *cryIAa1* در PCR تکثیر شده باشد از برش آنزیمی آن، دو قطعه با اندازه های ۵۲۴ و ۶۶۹ جفت باز حاصل می گردد. اما اگر محصول واکنش ژن *cryIAG1* باشد، بعد از برش آنزیمی SmaI، دو باند با اندازه های ۱۵۴ و ۷۸۸ جفت باز در ژل رؤیت می شود. بافر مناسب برای فعالیت هر آنزیم و دمای بهینه با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد. برای بررسی صحت عملکرد آنزیم های برشی از وکتور pET30a استفاده گردید.

جدول ۳-۳ - لیست تهیه شده از آنزیم های برشی اختصاصی برای هر کدام از ژن های *cryIAa1* و *cryIAG1*

<i>cryIAa1</i> gene			<i>cryIAG1</i> gene		
Enzyme	Number of cut	Restriction site	Enzyme	Number of cut	Restriction site
BanII	1	2693	BceAI	1	2020
BspM I	1	159	Cfr10 I	1	2507
BstAP I	1	415	Hpy99 I	1	3853
Ec1136 II	1	1869	PshA I	1	1610
HPa I	2	372 and 289	Sal I	1	3854
MscI	1	2038	Sma I	1	3005
PciI	1	176	Xma I	1	3005
SacI	1	1869			
SpeI	1	703			

۳-۲-۳- ژن های *cry1Ha* و *cry1Hb*

ژن های کاندید بعدی برای همسانه سازی، *cry1Hb* و *cry1Ha* بودند. این ژن ها بر اساس نتایج پروتئومیکس پنج سویه IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEP انتخاب شدند. در سویه IE-1، ۱۲ قطعه پپتیدی با طول بیش از شش اسیدآمیننه گزارش شده است که با حدود اطمینان بالای ۹۵ درصد به طور اختصاصی تنها با پروتئین Cry1Hb هم خوانی دارد. با این ۱۲ قطعه پپتیدی (بلاست پروتئین به پروتئین)، و TBlastN (بلاست پروتئین به نوکلئوتید) انجام گرفت تا مطمئن شویم پپتیدهای گزارش شده مربوط به پروتئین Cry1Hb می باشد. پراکنش این ۱۲ پپتید در طول پروتئین و ژن *cry1Hb* نیز مورد بررسی قرار گرفت. در سویه IP-2 باکتری Bt نیز، نتایج حاصل از پروتئومیکس ۲۰ قطعه پپتیدی با طول بیش از شش اسیدآمیننه، گزارش کرد که با حدود اطمینان بالای ۹۵ درصد، به طور اختصاصی با پروتئین Cry1Ha هم خوانی داشت. نتایج بلاست نشان می دهد که این پپتیدها عموماً در انتهای آمینی پروتئین شناسایی شده قرار گرفته اند که این بخش در بین پروتئین های Cry به ویژه خانواده Cry1 بسیار حفاظت شده است. نتیجه بر این شد که با توجه به مکان قرارگیری پپتیدهای شناسایی شده برای هر پروتئین، پرایمرهای degenerate برای تکثیر ژن مدنظر طراحی شود. بنابراین اولین قدم انجام هم ترازی (alignment) بین پپتیدهای شناسایی شده و ژن مورد نظر بود تا مکان قرارگیری این پپتیدها روی ژن مشخص شود. دوازده پپتید مربوط به پروتئین Cry1Hb از نوکلئوتید ۱۳۰۰ تا ۳۱۰۰ روی ژن مربوطه قرار گرفته اند. اما هدف یافتن مکانی بود که اولاً این پپتیدها با هم هم پوشانی داشته باشند و دوماً توالی نوکلئوتیدی مشابه به هم و سوماً مشابه به ژن رفرنس داشته باشند. در مورد پروتئین Cry1Ha موجود در سویه IP-2 نیز مانند پروتئین قبلی عمل شد. ابتدا مکان قرارگیری این پپتیدها روی ژن مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت و آغازگرها از مکانی از ژن انتخاب شدند که پپتیدها هم پوشانی داشتند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن های *cry1Hb* و *cry1Ha* در جدول ۳-۴ آمده است. محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت Stab Vida ارسال شدند.

جدول ۳-۴- آغازگرهاي طراحي شده براي تكثير ژن هاي *cry1Hb* و *cry1Ha*

GC%	Product size (bp)	T _m (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Target gene	Primer
38.1	209	58.9	GGGAATTTAGAGTTTCTCGAA	<i>cry1Hb</i>	E1-Hb-F
38.9		58.8	ATGAATCATGGCGATGTT		E1-Hb-R
29.2	570	51.6	GATARATTAMAAGCGGATACGAAT	<i>cry1Ha</i>	P2-Ha-F
38.9		52.1	TTCATAGACTGACGCATA		P2-Ha-R
38.9		52.5	GCTTYCATANGYTTTCGTC		P2-Ha-R.deg

Y= C or T, R= A or G, M= C or G and N= any base.

ژن *cry1G* ۳-۲-۴

ژن كانديد بعدي براي همسانه سازي، ژن *cry1G* بود. در نتايج پروتئوميكس سوبه Δ Ep وجود پروتئين Cry1G گزارش شد. براي طراحي آغازگر اختصاصي ژن *cry1G*، ابتدا تمام هولوتايب هاي خانواده Cry1، هم تراز^۱ شدند و نواحي حفاظت شده و نواحي متغير در اين خانواده ژني مشخص شدند. انتهاي ۵' اين ژن ناحيه متغير است در نتيجه از ناحيه متفاوت اين ژن با ساير ژن ها اقدام به طراحي آغازگر شد. سپس، تمامي اعضاي خانواده ژني *cry1G* كه شامل *cry1Ga*، *cry1Gb* و *cry1Gc* هستند، هم تراز شدند تا آغازگري اختصاصي براي تمام اعضاي اين خانواده طراحي شود. مخلوط واكنش و برنامه ي حرارتي واكنش زنجيره اي پلي مرز مطابق جدول ۳-۵ و ۳-۶ آماده گشت. محصولات PCR براي توالي يابي ارسال و توالي هاي دريافتي ويرايش و نتايج در NCBI بررسي شد.

¹ Align

جدول ۳-۵- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای تکثیر ژن *cryIG*

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/μl	1	0.04 U/μl
dNTPs mix	10 mM	1	0.4 mM
Forward primer	10 μM	1	0.4 μM
Reverse primer	10 μM	1	0.4 μM
Template DNA	100 ng/μl	1	4 ng/μl
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

جدول ۳-۶- برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای تکثیر ژن *cryIG*

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	45	45 sec	35
Extension	72	90 sec	
Final extension	72	10 min	1

۳-۲-۵- ژن *cryIAd*

پروتئین CryIAd در نتایج پروتئومیکس سویه IE-1 گزارش شد. در نتیجه، ژن کاندید بعدی، ژن *cryIAd* بود. طبق نتایج پروتئومیکس، ۲۹ پپتید اختصاصی برای این ژن با حدود اطمینان بالای ۹۵ درصد وجود داشت. در نتیجه، ابتدا مکان قرار گیری این پپتیدها در ژن *cryIAd* مشخص گشت. سپس، پس از هم ترازی تمامی ژن های خانواده ژنی *cryI*، آغازگری اختصاصی برای این ژن طراحی شد. مابقی مراحل مشابه آنچه پیشتر توضیح داده شد، انجام گرفت.

3-2-6- *cryIIa* ژن

طبق نتایج تعیین محتوای ژنی سویه‌های باکتری Bt، ژن *cryII* در پنج سویه‌ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEP باکتری Bt وجود داشت. نتایج تعیین توالی و بلاست نشان داد که قطعه‌ی ژن تکثیر شده، مربوط به ژن *cryIIa* می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی کامل ژن *cryIIa* در بانک ژن NCBI، ۲۹۶۵ جفت‌باز است که از نوکلئوتید شماره‌ی ۳۵۵ تا ۲۵۱۴ مربوط به توالی کد شونده یا CDS ژن می‌باشد. در نتیجه، سه جفت آغازگری هم‌پوشانی دارند، برای تکثیر کل ژن ۲۱۶۰ نوکلئوتیدی *cryIIa* طراحی شد (جدول ۳-۷). مخلوط واکنش مشابه جدول ۳-۲ که پیشتر در بخش تعیین محتوای ژنی توضیح داده شده است، تهیه گشت. برنامه‌ی حرارتی واکنش-های زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق جدول ۳-۸ تنظیم شد. محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۳-۷- آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر کل ژن *cryIIa*

GC%	T _m (°C)	Primer sequence (5' - 3')	Primer name	Primer number
39.2	61.1	AGAGCAACTTAATCAAGCAGAGA	Cry1I-33F	First pair of primers
36.4	62.1	TTGGGCTGTAGTTTTAATTGGA	Cry1I-1246R	
39.2	64.3	CGCATTAGAATTGATGTTTCGTTTC	Cry1I-866F	Second pair of primers
39.2	63.1	TCCAAGCACCATTTGTGAATGTA	Cry1I-2253R	
34.8	63.1	TGAGCCAAATAGCATTACACAAA	Cry1I-1883F	Third pair of primers
38.1	63.5	TGATGAAAAGAAAAGCCCTCA	Cry1I-2957R	

جدول ۳-۸- برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن *cryIIa*

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	96	1 min	1
Denaturation	96	1 min	
Annealing	56-58	45 sec	35
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10 min	1

نتایج واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای جفت آغازگرهای دوم و سوم برای هر پنج سویه ی مورد بررسی، مثبت بود اما هیچ قطعه ای با جفت آغازگر اول در قسمت ابتدایی ژن یا انتهای ۵' این ژن تکثیر نگشت. در نتیجه با استفاده از تکنیک راه ژنگان پیمایی، همان طور که پیشتر در مورد ژن *cryIAg* توضیح داده شده، اقدام به تکثیر قسمت ابتدایی ژن *cryIIa*، تنها در سویه ی IE-1 باکتری Bt شد. توالی ۱۹۴۵ نوکلئوتید از ژن مذکور تعیین شده بود، برای تکثیر انتهای ۵'، لازم بود به سمت بالادست ژن حرکت شود، بنابراین آغازگرهای معکوس GSP1 و GSP2 طراحی شدند (جدول ۳-۹). حد فاصل بین دو آغازگر معکوس طراحی شده، ۳۰۰ نوکلئوتید می باشد. مخلوط واکنش و برنامه ی حرارتی PCRهای اول و دوم مطابق جداول ۳-۱۰، ۳-۱۱ و ۳-۱۲ آماده گردید.

جدول ۳-۹ - آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک راه ژنگان پیمایی *cryIIa*

T _m (°C)	Primer sequence (5'-3')	Target gene	Primer
71.7	TAGATTCAGCCCTGCCAATGATTCAGT	<i>cryIIa</i>	CryIIa-GSP1
67.5	AAGTCGTACTIONTGTAAAACTTGGATGCG		CryIIa-GSP2

جدول ۳-۱۰ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در اولین PCR راه ژنگان پیمایی

Components	Initial concentration	Used volume (µl)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	10	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/µl	1	0.02 U/µl
dNTPs mix	10 mM	4	0.8 mM
Adaptor primer (forward)	10 µM	1	0.2 µM
GSP1 or GSP2 primer (reverse)	10 µM	1	0.2 µM
Template DNA	100 ng/µl	2	4 ng/µl
Sterile bidistilled water		31	
Total volume		50	

جدول ۳-۱۱ - برنامه حرارتی واکنش های زنجیره ای پلی مرز راه ژنگان پیمایی، اولین PCR

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	72 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	65	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

جدول ۳-۱۲- برنامه حرارتي واكنش هاي زنجيره اي پلي مراز راه ژنگان پيمايي، دومين PCR

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	70 (-1°C/cycle)	30 sec	7
Extension	72	3 min	
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	63	45 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

پس از بررسي محصولات PCR اول و دوم روي ژل آگارز يك درصد، قطعات تكثير شده توالي يابي و ويرايش شدند. در نتيجه، توالي نوكلئوتيدي كل ژن *cryIIa* به دست آمد. با مقايسه ي توالي ژن به دست آمده با ژن هاي موجود در بانك ژن NCBI، و از طريق مكاتبه با Prof. Neil Crickmore (University of Sussex, UK)، مسؤل كميته نامگذاري توكنين هاي باكتري Bt، نام *cryIIa38* به ژن يافت شده در سوبه IE-1، اطلاق گشت.

۳-۲-۷- همسانسازی ژن *cryIIa38*

از میان ژن های کاندید، ژن *cryIIa* برای همسانسازی انتخاب شد. توالی کامل ژن *cryIIa* شامل ناحیه ی رمز شونده (CDS) و نیز نواحی ترجمه نشده انتهای ۳' و ۵' (3' and 5' UTR)، به اندازه ی ۳۱۶۲ جفت باز، توالی یابی و در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی MG584186 ثبت گردید. برای همسانسازی ژن *cryIIa38* ابتدا از یک وکتور همسانسازی^۱ و سپس از یک وکتور بیانی^۲ استفاده شد. به این ترتیب که، قطعه ژن مورد نظر توسط آغازگرهای همسانسازی که دارای جایگاه های مناسب برای آنزیم های برشی بودند، تکثیر و به وکتور همسانسازی منتقل شد. سپس، با استفاده از آنزیم های برشی و جوش، قطعه ی مورد نظر از وکتور همسانسازی جدا و در وکتور بیان منتقل گردید.

۳-۲-۷-۱- انتخاب وکتور

برای همسانسازی ژن *cryIIa38* از وکتور همسانسازی تی، به نام pGEM-Teasy^۴ (شکل ۳-۳) و وکتور بیانی^۵ pET30a(+) (شکل ۳-۴) استفاده شد. از ویژگی های وکتورهای تی، ایجاد انتهاهای چسبنده برای همسانسازی آسان قطعات حاصل از PCR می باشد. وکتورهای pGEM-Teasy، وکتورهایی خطی با یک رشته-ی تیمیدین در هر دو انتهای ۳' هستند. انتهای چسبنده ی تی^۶ (تیمیدین) در محل اتصال، از طریق ممانعت از حلقوی شدن مجدد وکتور و فراهم آوردن انتهاهای چسبنده مناسب برای قطعات حاصل از PCR، کارایی الحاق محصولات PCR را در همسانسازی افزایش می دهد. وکتور pGEM-Teasy، راه اندازهای T7^۷ و SP6 برای ارا.ان.ای پلی مرز و هم چنین ناحیه ی کد شونده ای برای آنزیم بتا-گالاکتوزیداز^۸، در ناحیه ی همسانسازی چندگانه^۹ دارد. بنابراین به دلیل الحاق قطعه دی.ان.ای به ناحیه ی همسانسازی، درون پیتیدآلفا، کلنی های نوترکیب، در محیط کشت حاوی معرف X-Gal-IPTG، از طریق غربالگری کلنی های آبی/سفید، قابل تشخیص هستند.

¹ Untranscribed Region

² Cloning Vector

³ Expression Vector

⁴ Promega, Wisconsin, USA

⁵ Novagen, USA

⁶ T-Overhangs

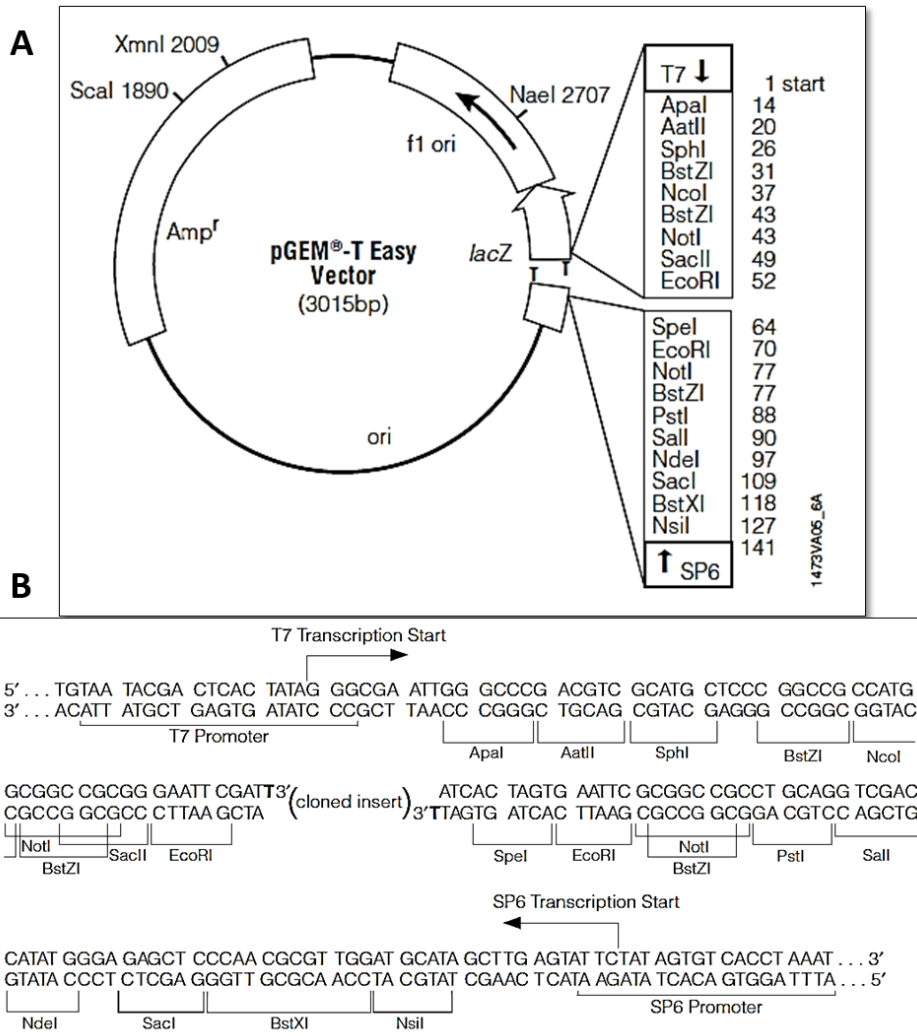
⁷ Promoter

⁸ B-Galactosidase

⁹ Multiple Cloning Site

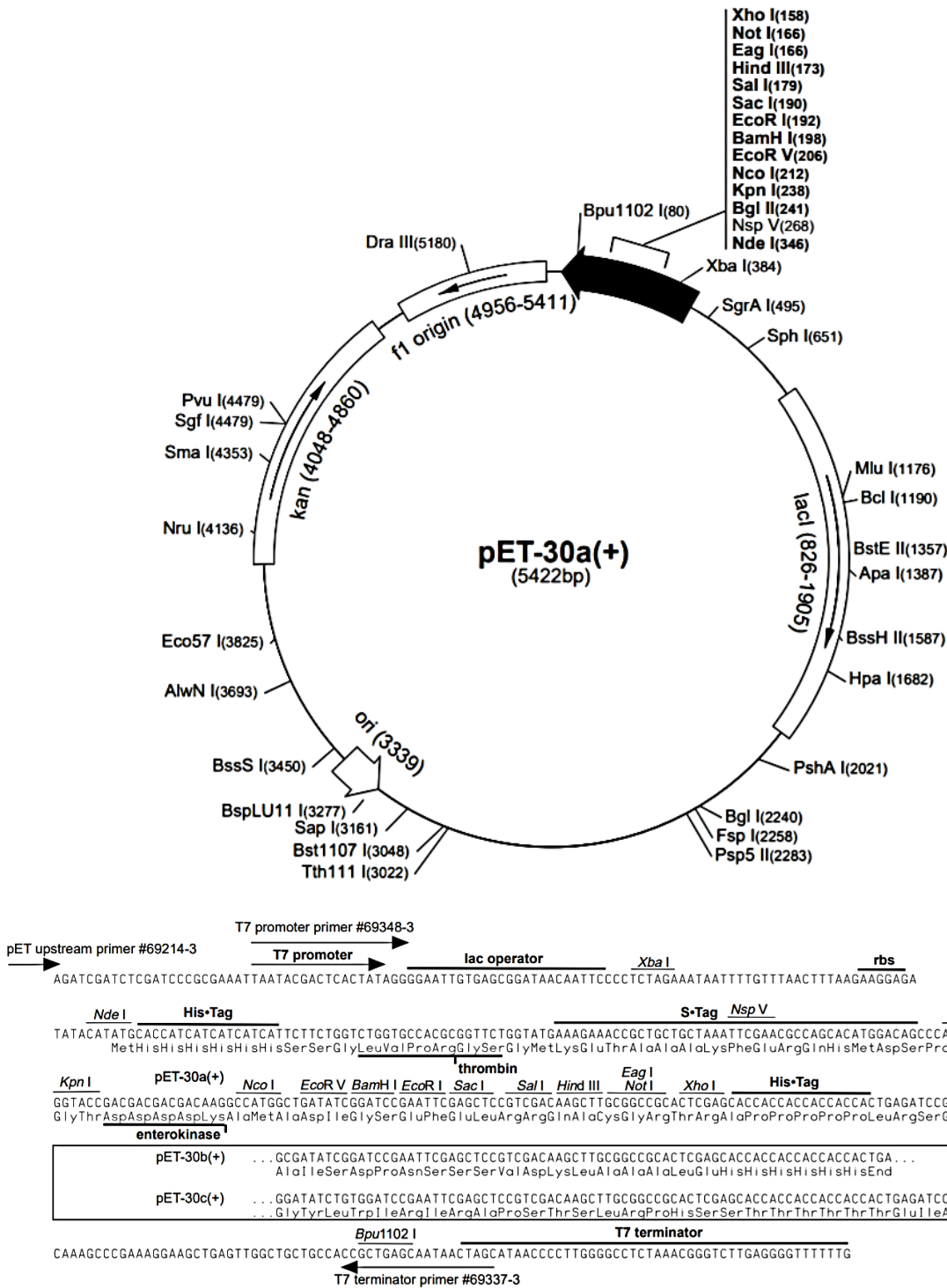
وكتور بياني pET30a(+), يك پلاسميد 5421 جفت بازي است كه در انتهاي آميني تواليهاي His-Tag و S-Tag، و همچنين جايگاه برش براي آنزيمهاي thrombin و enterokinase دارد، به علاوه، در انتهاي كربوكسيلى نيز، توالى His-Tag قرار دارد. بعد از انتخاب وكتورهاي مورد استفاده، آنزيمهاي برشى مورد استفاده در همسانه-سازى تعيين شد. بدين ترتيب كه، فهرستى از آنزيمهاي برشى كه جايگاه اثر روى قطعه ژن دارند، با استفاد از نرم افزار آنلاين¹ NEBcutter (Version 2.0) تهيه و با جايگاههاي برش موجود در وكتور بياني و همسانه سازى مقايسه گرديد (شكل 3-8). با اين هدف كه، آنزيم برشى انتخابى جايگاه برشى در ژن *cryIIa38* نداشته باشد. نتيجه اين مقايسه نشان داد كه، سه آنزيم برشى XhoI، HindIII و NdeI بين وكتور و قطعه مشترك هستند از اين رو از اين سه آنزيم استفاده نشد. آنزيمهاي برشى انتخابى براى همسانه سازى ژن *cryIIa38* BamHI و Sall بودند.

¹ [Http://Nc2.Neb.Com/Nebcutter2/](http://Nc2.Neb.Com/Nebcutter2/)



شکل ۳-۳- نقشه وکتور همسان سازی pGEM-Teasy. A: تصویر حلقوی وکتور و B: توالی نوکلئوتیدی

طرفین مکان همسان سازی (www.promega.com).



شکل ۳-۴- نقشه و کتور بياني pET30a(+). تصوير بالا فرم حلقوي و کتور و تصوير پايين توالي نوکلئوتيدي

طرفين مکان همسانه سازي را نشان مي دهد (www.addgene.org).

سپس، سازگاری آنزیم‌های برشی کاندید برای انجام هضم دوتایی^۱، در نرم‌افزار NEBcutter مورد بررسی قرار گرفت. بعد از حصول اطمینان از سازگار بودن آنزیم‌های برشی، جایگاه برشی برای دو آنزیم Thrombin و Enterokinase، روی توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین حاصل از ژن *cryIIa38* نیز بررسی شد. قبل از شروع همسانسازی کلیه مراحل همسانسازی *cryIIa38* در حامل بیانی pET-30a(+) به صورت شبیه‌سازی رایانه‌ای (*in silico*) در دو نرم‌افزار Clone Manager و SnapGene Viewer شبیه‌سازی شد.

۳-۲-۲- طراحی آغازگر و تکثیر ژن *cryIIa38* برای همسانسازی

به منظور تکثیر ژن *cryIIa38* برای همسانسازی، یک جفت آغازگر با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های برشی BamHI و SalI به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' ژن مورد نظر قرار دارند، طراحی شد (جدول ۳-۱۳).

جدول ۳-۱۳ - آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن *cryIIa38* برای همسانسازی

GC%	T _m (°C)	Primer sequence* (5'-3')	Primer
33.4	64.2	GGATCCATGAAACTAAAGAATCAAGAT	Ia38-F
44	64.8	GTCGACCTACATGTTACGTTACGCTCAATC	Ia38-R

* بخش‌های مشخص شده در آغازگرهای پیش‌رو و معکوس، مربوط به جایگاه برشی آنزیم‌های برشی می‌باشد. برای تکثیر صرفاً ناحیه‌ی کد شونده‌ی ژن *cryIIa38*، به طول ۲۱۰۰ جفت‌باز، پس از طراحی آغازگر، مخلوط واکنش و برنامه‌ی حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مطابق جداول ۳-۱۴ و ۳-۱۵ تهیه شد.

جدول ۳-۱۴ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای تکثیر کامل ژن *cryIIa38* در PCR

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	10	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/μl	1	0.02 U/μl
dNTPs mix	10 mM	2	0.4 mM
Forward primer	10 μM	1	0.2 μM
Reverse primer	10 μM	1	0.2 μM
Template DNA	100 ng/μl	2	4 ng/μl
Sterile bidistilled water		33	
Total volume		50	

¹ Double digestion

جدول ۳-۱۵- برنامه حرارتي واكنش هاي زنجيره اي پلي مراز تكثير كامل ژن *cryIIa38*

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	91	1 min	
Annealing	59	45 sec	35
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10 min	1

محصولات PCR قبل از استفاده براي همسانه سازي، با كيت استخراج^۱ JBI scientific DNA extraction، پاك سازي شدند و قطعه ژني براي انتقال به وكتور همسانه سازي آماده گرديد.

۳-۲-۷-۳- وكتور pGEM-Teasy

قبل از انتقال قطعه ژني *cryIIa38* به وكتور بياني از يك وكتور همسانه سازي تي، به نام-pGEM Teasy^۲ استفاده شد. براي الحاق قطعه ۲۱۰۰ جفت بازي حاصل از تكثير كل ژن *cryIIa38*، به وكتور همسانه سازي تي، دم پلي A (آدينين) به هر دو انتهاي قطعات تكثير يافته، اضافه گرديد. براي اضافه كردن دم پلي A به انتهاي صاف قطعات تكثير شده در PCR، مخلوط واكنش، بعد از آماده سازي مطابق جدول ۳-۱۶، به مدت ۳۰ دقيقه در دماي ۷۲ درجه سلسيوس نگه داشته شد.

جدول ۳-۱۶- مقادير و غلظت مواد مصرف شده براي افزودن دم پلي A، به انتهاي صاف ژن *cryIIa38*

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	1	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/μl	1	0.02 U/μl
dATPs mix	10 mM	2	0.4 mM
PCR product	50 ng/μl	5	25 ng/μl
Sterile bidistilled water		1	
Total volume		10	

¹ Dubuque, Iowa, USA

² Promega, Wisconsin, USA

الحاق^۱ محصول PCR دارای دم پلی A، به وکتور pGEM-Teasy، با تهیه مخلوط واکنش الحاق مطابق جدول ۳-۱۷ انجام گرفت. مخلوط آماده شده، در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) به مدت یک ساعت نگه داشته شد.

جدول ۳-۱۷ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در واکنش الحاق وکتور pGEM-Teasy.

Component	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
2X ligation buffer	2X	5	1X
T4 DNA lagase	1 U/μl	1	0.1 U/μl
pGEM-Teasy vector	50 ng/μl	0.5	2.5 ng/μl
Purified PCR product with poly-A tail	50 ng/μl	2	10 ng/μl
Sterile bidistilled water	-	1.5	-
Total volume		10	

پس از انجام واکنش الحاق، وکتور pGEM-Teasy حاوی قطعه‌ی ژنی مور نظر، به درون سلول‌های مستعد که توانایی همانندسازی دارند، وارد شد. تراریخت‌سازی^۲ با روش شوک حرارتی با استفاده از سلول‌های مستعد DH10β از باکتری *E. coli* انجام گرفت. از سلول‌های مستعد DH10β تنها برای همسانه‌سازی استفاده می‌شود. انتقال وکتور به درون سلول‌های مستعد به این ترتیب انجام شد که، دو میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های DH10β از فریزر -۸۰ درجه سلسیوس خارج و دو میکرولیتر از مخلوط واکنش الحاق حاوی قطعه^۳ و بدون قطعه (به‌عنوان شاهد)، به میکروتیوب‌ها به صورت جداگانه اضافه گردید. سپس سلول‌ها بیست دقیقه روی یخ، ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و مجدداً دو دقیقه روی یخ قرار گرفتند. به هر میکروتیوب ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در ظروف پتری حاوی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ μg/ml) و معرف X-Gal-IPTG منتقل و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی تراریخت شدن کلنی‌های نو ترکیب، از کلنی‌های سفید رنگ رشد کرده، ۱۶ کلنی به صورت تصادفی انتخاب شدند. از کلنی‌های انتخابی ابتدا زیرکشت تهیه شد و سپس برای

^۱ Ligation

^۲ Transformation

^۳ Insert

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز^۱، برای تأیید الحاق دی.ان.ای تکثیر می‌شود و کتور pGEM-Teasy، مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. با نوک یک تیپ استریل، یک تک کلنی از روی محیط کشت برداشته و به آب مقطر درون میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگه داشته، و سپس، به مدت یک دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از روش‌های به دست آمده، سه میکرولیتر برداشته و در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده گردید. آغازگرهای مورد استفاده در این PCR، آغازگرهای مربوط به قطعه تکثیر شده و هم‌چنین آغازگرهای خود و کتور بودند. برنامه‌ی حرارتی و مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق جداول ۱۸-۳ و ۱۹-۳ تنظیم شد.

جدول ۳-۱۸ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای غربال‌گری کلونی‌های نو ترکیب به وسیله PCR

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	10	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/μl	1	0.02 U/μl
dNTPs mix	10 mM	2	0.4 mM
Forward primer (T7 or Ia38-F)	10 μM	1	0.2 μM
Reverse primer (SP6 or Ia38-R)	10 μM	1	0.2 μM
Template DNA	-	2	-
Sterile bidistilled water		33	
Total volume		50	

جدول ۳-۱۹ - برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای غربال‌گری کلونی‌های نو ترکیب

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	1 min	
Annealing	50	30 sec	30
Extension	72	3 min	
Final extension	72	10 min	1

¹ Clony PCR

محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت و در صورت تکثیر قطعه دی.ان.ای مورد نظر، کلنی باکتریایی مربوطه در چهار میلی لیتر از محیط مایع LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ($100 \mu\text{g/ml}$)، کشت و به مدت یک شب در دمای 37°C درجه سلسیوس با دور ۱۸۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. وکتورهای حاوی الحاق موجود در سلول های باکتریایی DH10 β ، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید^۱ NucleoSpin Plasmid و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شدند. بعد از تعیین غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با نانودراپ، هضم دوتایی با استفاده از آنزیم های برشی BamHI و SalI، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C درجه سلسیوس انجام گرفت (جدول ۳-۲۰). برای توقف واکنش هضم، مخلوط تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C درجه سلسیوس نگه داشته شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. توالی نوکلئوتیدی، کلنی هایی که دو باند مربوط به وکتور pGEM-Teasy و ژن *cryIIa38* با اندازه ی صحیح روی ژل داشتند، به دست آمد.

جدول ۳-۲۰- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای هضم آنزیمی وکتور نو ترکیب pGEM-Teasy

Component	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X Fast digestion buffer	10X	10	1X
BamHI restriction enzyme	1U/ μl	2	0.02 U/ μl
SalI restriction enzyme	1U/ μl	2	0.02 U/ μl
Recombinant vector	200 ng/ μl	15	30 ng/ μl
Sterile bidistilled water	-	71	-
Total volume		100	

پس از هضم آنزیمی وکتور pGEM-Teasy حاوی ژن *cryIIa38*، باند مربوط به قطعه ی ژنی از ژل آگارز جدا و با استفاده از کیت NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit استخراج شد. ژن *cryIIa38* برای انتقال به وکتور بیانی pET-30a(+) آماده گردید.

^۱ MACHEREY-NAGEL, Germany

۳-۲-۴- وكتور بيان pET-30a(+)

قبل از انتقال قطعه‌ی ژنی به pET-30a(+)، وكتور بياني مورد استفاده توسط آنزيم‌های برشی BamHI و SalI برش داده شد. برای هضم دوتایی وكتور pET-30a(+)، مخلوط واكنش مطابق جدول ۳-۲۱ تهیه گشت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و برای توقف واكنش هضم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگه داشته شد.

جدول ۳-۲۱- مقادير و غلظت مواد مصرف شده برای هضم دوتایی وكتور pET-30a(+)

Component	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X Fast digestion buffer	10X	10	1X
BamHI restriction enzyme	1U/μl	2	0.02 U/μl
SalI restriction enzyme	1U/μl	2	0.02 U/μl
Recombinant vector	20 ng/μl	50	10 ng/μl
Sterile bidistilled water	-	36	-
Total volume		100	

بعد از هضم آنزیمی و خطی شدن وكتور pET-30a(+)، برای جلوگیری از حلقوی شدن مجدد وكتور، با استفاده از آنزیم فسفاتاز قلیایی^۱، دو سر وكتور دفسفوریل شده شد. به این ترتیب که، ۱۰ میکرولیتر از بافر 10× دفسفریلاسیون، با یک واحد از آنزیم فسفاتاز قلیایی (Roche, Basel, Switzerland)، غلظت مورد نظر از وكتور خطی شده مخلوط و با آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط تهیه شده به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و برای توقف واكنش، به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس، نگه داشته شد.

الحاق قطعه‌ی ژنی استخراج شده از ژل آگارز به وكتور خطی و دفسفوریل شده‌ی pET-30a(+)، با استفاده از آنزیم T4 دی.ان.ای لیگاز (Promega Biosciences, Wisconsin, USA)، مطابق جدول ۳-۲۲ انجام گرفت. مخلوط تهیه شده با نسبت وكتور به قطعه یک به سه، به مدت یک شب در دمای چهار درجه

¹ Alkaline phosphatase

سلسیوس نگه داشته شد. واکنش الحاق با تیمار حرارتی ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه، غیر فعال گشت. تراریخت سازی و کتور نو ترکیب، مطابق آنچه پیشتر در مورد وکتور همسانه سازی pGEM-Teasy توضیح داده شده بود، انجام گرفت. با این تفاوت که در این مرحله از سلول های مستعد BL21 از باکتری *E. coli*، که برای بیان پروتئین مناسب هستند، استفاده شد. مطابق بخش قبل، تأیید همسانه سازی موفق، از طریق واکنش های زنجیره ای پلی مرز کلنی های باکتریایی رشد کرده روی محیط جامد LB و هضم دوتایی پلاسمید نو ترکیب استخراج شده از باکتری BL21، انجام شد. پلاسمید مربوط به سه کلنی باکتریایی مثبت، برای تعیین توالی با سه آغازگر (آغازگرهای پیش رو و معکوس قطعه ژن و پیش رو وکتور)، به شرکت StabVida ارسال گشت.

جدول ۳-۲۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده در واکنش الحاق وکتور pET-30a(+)

Component	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
2X ligation buffer	2X	10	1X
T4 DNA ligase	1U/μl	1	0.1 U/μl
pET-30a(+) vector	10 ng/μl	5	2.5 ng/μl
<i>cryIIa38</i> gene	20 ng/μl	3	3 ng/μl
Sterile bidistilled water	-	1	-
Final volume		20	

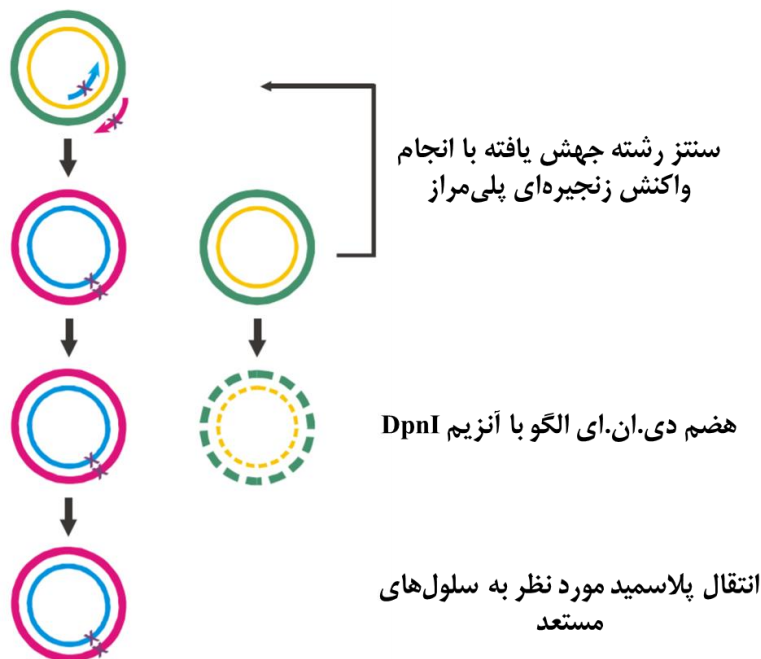
نتایج توالی یابی نشان داد که، ژن همسانه سازی شده در نوکلئوتید شماره ۳۴۶ با ژن *cryIIa38* تفاوت دارد، به این ترتیب که به جای نوکلئوتید آدنین، نوکلئوتید گوانین وجود دارد. این تفاوت منجر به تغییر اسید آمینه ای ایزولوسین به والین می شود. در نتیجه، با استفاده از تکنیک جهش زایی هدفمند، نوکلئوتید آدنین باید جایگزین نوکلئوتید گوانین می شد.

۳-۲-۸- جهش زایی هدفمند^۱

تغییر توالی نوکلئوتیدی ژن همسانه سازی شده، با روش جهش زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام گرفت. در این روش، تغییر نوکلئوتید با انجام یک PCR با استفاده از آغازگری که جهش مورد نظر

^۱ Site-directed mutagenesis (SDM)

در آن وارد شده است، صورت مي پذيرد. نکته ي مهم در جهش زايي هدفمند بر پايه ي PCR، طراحي مناسب آغازگر مي باشد. اساس کار به اين ترتيب است که (شکل ۳-۵)، پلاسميد مورد نظر با واکنش زنجيره اي پلي مراز و با استفاده از آغازگرهاي طراحي شده، تکثير مي شود. سپس، با استفاده از آنزيم برشي DpnI تحت شرايط بهينه، پلاسميدهاي مادري که حاوي نوکلئوتيد اشتباه هستند، هضم و حذف مي گردند. آنزيم DpnI با جايگاه شناسايي GATC، قطعاتي از دي.ان.اي را که متيله نشده، هضم مي کند. متيله شدن دي.ان.اي در زمان نسخه برداري در سيستم زنده (در اينجا در سويه ي مورد استفاده از باكتري *E. coli*)، اتفاق مي افتد. در نتيجه، قطعات دي.ان.اي تکثير شده در PCR، متيله نشده و توسط آنزيم DpnI هضم نمي شوند. به اين ترتيب پلاسميدهاي مادري که توالي نوکلئوتيدي اشتباه يا غير هدف دارند، حذف مي گردند. سپس، تعداد زيادي از نسخه هاي تکثير شده ي پلاسميد توسط PCR درون سلول هاي مستعد، مانند DH10 β و DH5 α (غير بياني)، ترنسفورم مي شود. پلاسميدهاي تراريخت شده، استخراج و توالي يابي مي شوند. در صورت اعمال صحيح جهش مورد نظر در توالي نوکلئوتيدي، پلاسميد نو ترکیب تهيه شده، به درون سلول هاي مستعد بياني (BL21)، منتقل مي شوند.



شکل ۳-۵- طرحي شماتيك از مراحل انجام جهش زايي هدفمند بر مبناي واکنش زنجيره اي پلي مراز (www.agilent.com).

۳-۲-۸-۱- طراحی آغازگر برای جهش‌زایی هدفمند

در طراحی آغازگر مناسب برای انجام جهش‌زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، شرایط زیر در نظر گرفته شد:

- حداقل هشت نوکلئوتید غیر هم‌پوشان در انتهای ۳'، هر دو آغازگر قرار داده شد.
- جفت آغازگرها در انتهای ۵' هم‌پوشانی داشتند.
- جهش مورد نظر، حداقل با فاصله‌ی چهار نوکلئوتیدی نسبت به انتهای ۵' و شش تا هشت نوکلئوتیدی نسبت به انتهای ۳' قرار داده شد.
- دمای ذوب جفت آغازگرها بیش از ۷۵ درجه سلسیوس تعیین گشت.
- طول آغازگرها بین ۲۵ تا ۴۵ جفت‌باز انتخاب گردید.
- حداقل یک نوکلئوتید سیتوزین یا گوانین در انتهای ۳' و ۵' در نظر گرفته شد.

با در نظر گرفتن شرایط مشروحه، یک جفت آغازگر برای انجام جهش‌زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز طراحی شد که اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده در جدول ۳-۲۳ آمده است.

جدول ۳-۲۳- آغازگرهای مورد استفاده برای انجام جهش‌زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Primer length (bp)	(°C)** T _m	Primer sequence * (5'-3')	Primer
40	70.3	CAAAAA <u>A</u> TATCAACTTATGCAAGAAATAAAGCACTTACAG	G346A-F
44	69.3	GCATAAGTTGATA <u>T</u> TTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATGTTC	G346A-R

* نوکلئوتیدهای مشخص شده در آغازگرها، نقطه‌ی اعمال جهش را نشان می‌دهند.
** دمای ذوب ذکر شده در جدول توسط وب‌سایت Sigma Aldrich محاسبه شده است و با دمای ذوب معمول برای آغازگرهای تکنیک جهش‌زایی هدفمند متفاوت است.

۳-۲-۸-۲- انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر پلاسمید جهش یافته

مخلوط واکنش و برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر پلاسمید جهش یافته، مطابق جداول ۳-۲۴ و ۳-۲۵ تهیه شد. وکتور نو ترکیب حاوی ژن *cryIIa38*، ۷۵۶۹ جفت‌باز دارد. برای تکثیر این وکتور

از آنزیم دی.ان.ای پلی‌مراز KAPA HiFi استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با غلظت کمتری از دی.ان.ای الگو و آغازگرها انجام گرفت.

جدول ۳-۲۴ - مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر پلاسمید جهش یافته.

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
5X KAPA HiFi reaction buffer	5X	5	1X
<i>taq</i> KAPA HiFi hot start	1U/ μl	1	0.04 U/ μl
dNTPs mix	10 mM	0.75	0.3 mM
Forward primer	10 μM	0.75	0.3 μM
Reverse primer	10 μM	0.75	0.3 μM
Template plasmid	100 ng/ μl	0.5	50 ng/ μl
Sterile bidistilled water	-	16.75	-
Total volume		25	

جدول ۳-۲۵ - برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر پلاسمید جهش یافته

Cycle step	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing	60	30 sec	16
Extension	72	6 min	
Final extension	72	15 min	1

۳-۲-۸-۳ - حذف پلاسمیدهای مادری

بعد از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با افزودن آنزیم DpnI به محصولات تکثیر شده، پلاسمیدهای مادری حذف شدند و تنها پلاسمیدهای جهش یافته باقی ماندند. به این ترتیب که مخلوط هضم آنزیمی با اضافه کردن یک واحد از آنزیم DpnI با غلظت ۱ U/ μl و دو میکرولیتر از بافر 10X به محصولات PCR، تهیه گشت. مخلوط تهیه شده، ابتدا به مدت ده دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سپس پنج دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و در نهایت دو دقیقه روی یخ نگه داشته شد.

۳-۲-۸-۴- ترنسفورم کردن وکتور نو ترکیب

پلاسمیدهای به دست آمده، ابتدا به سلول های مستعد DH10 β تراریخت شدند. سپس، با انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز کلنی های باکتریایی به دست آمده، قطعه ی ژنی تکثیر و برای توالی یابی نوکلئوتیدها به شرکت StabVida ارسال شد. پس از حصول اطمینان از بروز جهش در نوکلئوتید مورد نظر، پلاسمیدهای نو ترکیب جهش یافته، به سلول های مستعد BL21 منتقل شدند. ذخیره ی گلیسرولی ۵۰ و ۲۰ درصد، برای نگهداری سلول های BL21 نو ترکیب بیان کننده ی پروتئین Cry1Ia38، به ترتیب در دماهای ۲۰- و ۸۰- درجه سلسیوس تهیه گشت.

۳-۳- نتایج و بحث

همان طور که پیش تر بدان اشاره شد، فهرستی از پروتئین های کاندید برای همسانسازی، با توجه به جدید بودن ژن های ردیابی شده، بر اساس گزارش های LC/MS-MS و نتایج PCR، تهیه گشت. ژن های کاندید، شامل: *cry1Ag*، *cry1Ha*، *cry1Hb*، *cry1G*، *cry1Ad* و *cry1Ia* بودند. نتایج مربوط به ردیابی هر ژن کاندید به شرح زیر می باشد.

۳-۳-۱- ژن *cry1Ag*

بر اساس نتایج حاصل از پروتئومیکس، در فهرست پروتئین های شناسایی شده در کریستال های سویه ی IE-1 از باکتری Bt، پروتئینی به نام Cry1Ag، وجود داشت. با توجه به اینکه، روی فعالیت حشره کشی این پروتئین، پژوهشی صورت نگرفته بود، به عنوان کاندید مناسبی برای همسانسازی در نظر گرفته شد. در اجسام کریستالی سویه ی IE-1، ۸۰۸ پپتید با طول بیش از شش اسیدآمین، منسوب به Cry1Ag، شناسایی شده بود. از میان پپتیدهای شناسایی شده ی این پروتئین، ۴۹۱ توالی پپتیدی با حدود اطمینان بالای ۹۵ درصد، منحصر به فرد و بدون تکرار می باشد، که از آن بین، دو توالی پپتیدی مشخص شده در جدول ۳-۲۶، به طور اختصاصی با حدود اطمینان ۹۹ درصد، متعلق به پروتئین Cry1Ag بود. نتایج بلاست های *tblastn* و *blastp*، نشان می دهد

که قطعات پپتیدی مورد بررسی با شماره‌های دستیابی Q9S515.1 و AF081248.1، به ترتیب متعلق به پروتئین و ژن *cryIAg* هستند.

جدول ۳-۲۶- اطلاعات و توالی پپتیدهای منسوب به پروتئین *Cry1Ag*، با حدود اطمینان ۹۹ درصد.

Rank ¹	Coverage% ²	Accession number	Protein name	Contribution value ³	Sequence
126	71.6	sp Q9S515	Pesticidal crystal protein <i>Cry1Ag</i>	2	LSHVPMLSQAAGAVY TLR
126	71.6	sp Q9S515	Pesticidal crystal protein <i>Cry1Ag</i>	0.267	GWRGSHDITIQQGDDV FK

(۱) رتبه پروتئین شناسایی شده، در میان کل پروتئین‌های شناسایی شده (۳۰۳ پروتئین) در کریستال‌های باکتری Bt IE-1.

(۲) درصد پوشش پروتئین *Cry1Ag*، توسط کل پپتیدهای شناسایی شده منسوب به پروتئین *Cry1Ag*.

(۳) ارزش مشارکتی، ارزشی است بین صفر و دو، به مفهوم اختصاصی بودن یک پپتید برای یک پروتئین.

پس از تهیه‌ی نقشه پراکندگی پپتیدهای منسوب به *Cry1Ag*، روی توالی کامل ژن *cryIAg*

آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای تکثیر کل ژن، طراحی شد و واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام گرفت.

بر اساس نتایج به دست آمده، ۸۰۸ توالی پپتیدی پروتئین *Cry1Ag*، روی ۷۱/۶ درصد از ژن *cryIAg* را پوشانده

بودند، محل قرار گرفتن این پپتیدها در طول ژن با استفاده از هم‌ترازی پپتیدها در نرم‌افزار بلاست بانک ژن

NCBI، مشخص گردید.

برای تکثیر ژن ۳۸۵۹ جفت‌بازی *cryIAg* از چهار جفت آغازگری که هم‌پوشانی دارند، استفاده گشت.

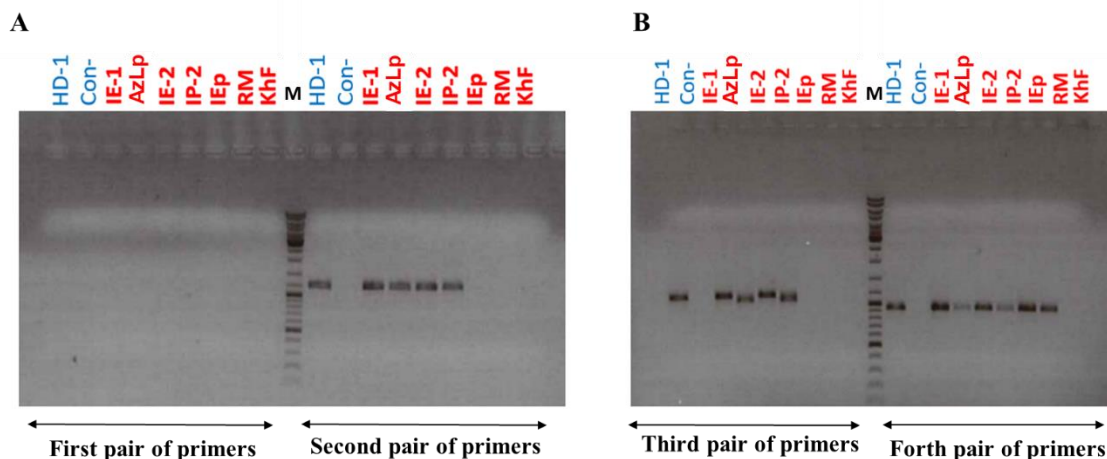
از دو شاهد منفی در این PCR بهره جسته شد؛ con- که به جای دی.ان.ای الگو، آب به مخلوط واکنش اضافه

شده بود و سویه‌ی HD-1 از باکتری Bt، که فاقد ژن *cryIAg* می‌باشد. شاهد مثبت برای انجام این واکنش

زنجیره‌ای پلی‌مراز، در دسترس نبود. تکثیر ژن *cryIAg*، در هر هفت سویه‌ی مورد مطالعه، بررسی گشت. بر

اساس نتایج به دست آمده، با استفاده از اولین جفت آغازگر طراحی شده، هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۳-۶).

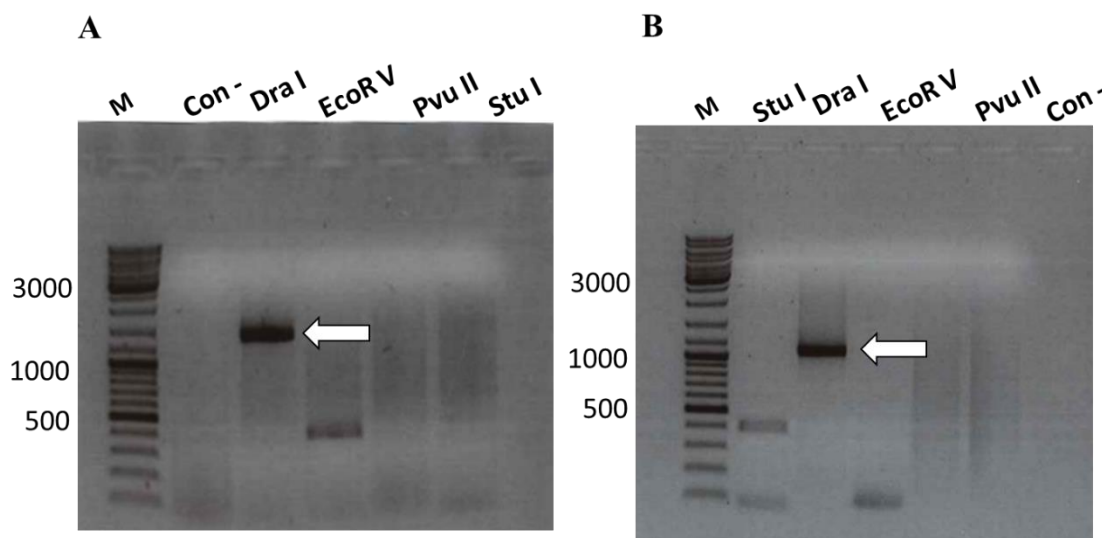
نکته قابل توجه آنکه، برای شاهد منفی HD-1، نیز مانند سایر سویه های باکتری Bt، با استفاده از جفت آغازگرهای دوم، سوم و چهارم، قطعه ای با اندازه ی صحیح تکثیر یافت.



شکل ۳-۶- نتیجه ی واکنش های زنجیره ای پلی مرز برای تکثیر ژن *cry1Ag*. تصویر A؛ قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای اول و دوم، و تصویر B؛ قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای سوم و چهارم، را نشان می دهد.

بر اساس توالی های نوکلئوتیدی قطعات ژنی تکثیر شده در سویه های HD-1 و IE-1، با استفاده از نرم افزار Genious، توالی اجماع با طول ۲۸۲۴ جفت باز حاصل شد. نتایج بلاست این دو توالی اجماع نشان داد که در مورد سویه ی مرجع HD-1، بخشی از ژن *cryIAa*، و در مورد سویه ی IE-1، بخشی از ژن *cryIA* تکثیر شده بود. این موضوع و همچنین شباهت زیاد دو ژن *cryIAg* و *cryIAa* (۹۷ درصد تطابق)، دلیل تکثیر قطعات ژنی در سویه ی HD-1 را مشخص می کند. در ادامه، با استفاده از تکنیک راه ژنگان پیمایی، توالی نوکلئوتیدی قسمت ابتدایی ژن *cryIAg* که توسط آغازگرهای طراحی شده، تکثیر نشده بود، مشخص گشت. همان طور که در قسمت مواد و روش به تفصیل شرح داده شده است، در قدم اول؛ دی.ان.ای ژنومی با کیفیت، خلوص و غلظت زیاد تهیه گردید. سپس؛ سهم های متفاوتی از دی.ان.ای تهیه و هر کدام به طور کامل با استفاده از آنزیم های برشی مختلف که انتهای صاف ایجاد می کنند، هضم شدند و کتابخانه های ژنومی آماده گردید. پس از تهیه ی کتابخانه های ژنومی *DraI*، *EcoR V*، *PvuII* و *StuI*، اولین واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام گرفت (شکل ۳-۳).

۷، تصویر A). با استفاده از محصولات اولین PCR، با حرکت روی ژن به سمت بالادست ژن، دومین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد (شکل ۳-۷، تصویر B).



شکل ۳-۷- نتیجه‌ی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز اول (A) و دوم (B) برای تکثیر ژن *cry1Ag* در تکنیک راه ژنگان‌پیمایی. حرف M؛ نشان دهنده‌ی مارکر، con-؛ شاهد منفی که به جای کتابخانه‌ی ژنومی از آب استفاده شده است، *DraI*، *EcoRV*، *PvuII* و *StuI*؛ کتابخانه‌های ژنومی تهیه شده، می‌باشد.

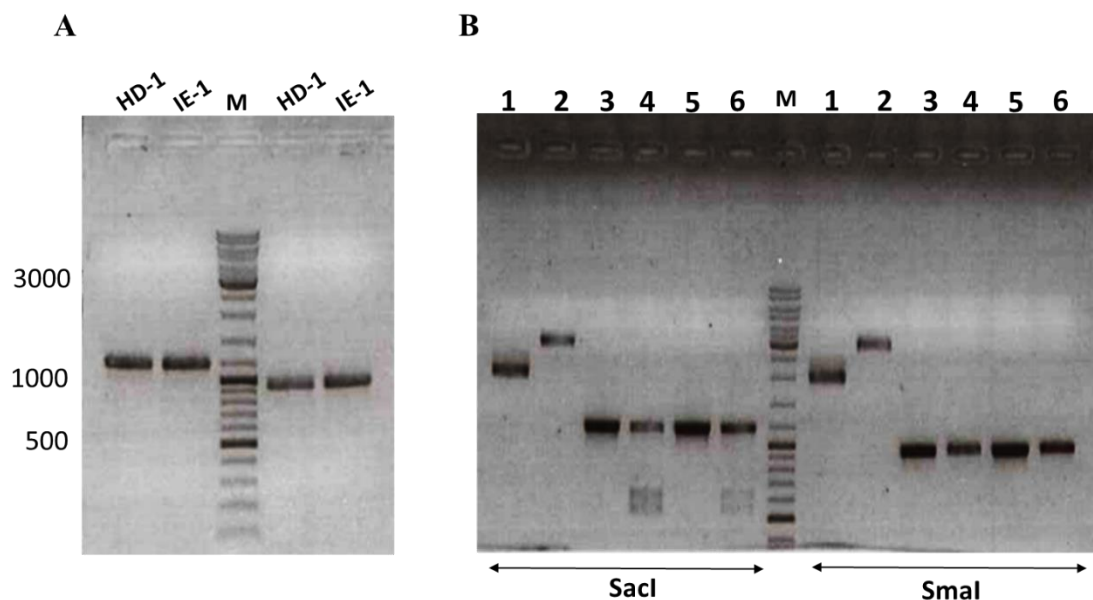
در اولین PCR، با استفاده از آغازگر اختصاصی شماره یک (GSP1)، در کتابخانه‌ی ژنومی *DraI* و *EcoRV*، قطعاتی تکثیر گشت. سپس، در دومین PCR با استفاده از محصولات PCR قبلی و آغازگر اختصاصی شماره دو (GSP2)، باندهایی در کتابخانه‌های *DraI*، *EcoRV* و *StuI* مشاهده شد. انتظار می‌رفت، که قطعه‌ی تکثیر شده در دومین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، اندازه‌ی کوچک‌تری نسبت به اولین محصول داشته باشد، زیرا جهت حرکت به سمت بالادست ژن می‌باشد، و آغازگر GSP2 به قسمت ناشناخته ژن نزدیک‌تر است و آغازگر GSP1 نسبت به بخش ناشناخته در فاصله دورتری قرار دارد. با توجه به اندازه‌ی قطعات تکثیر شده، در دو PCR متوالی، قطعات تکثیر شده در کتابخانه‌ی ژنومی *DraI*، از نسبت اندازه‌های صحیحی برخوردار هستند. قطعه‌ی تکثیر شده در اولین PCR کتابخانه‌ی ژنومی *DraI*، حدوداً ۲۰۰۰ جفت‌باز و در دومین PCR، ۱۵۰۰ جفت‌باز، طول دارد. نتیجه‌ی تعیین توالی قطعات تکثیر شده در هر دو PCR در کتابخانه‌ی ژنومی *DraI*، نشان می‌دهد، که ژن مورد

نظر به طور کامل تکثیر گردیده است. نتایج بلاست توالی اجماع به دست آمده، حاکی از آن بود که ژن تکثیر شده، ۱۰۰ درصد با ژن *cryIAa* و ۹۴ درصد با ژن *cryIAG* مطابقت دارد. در نتیجه، ژن *cryIAa* به جای ژن *cryIAG* تکثیر شده بود. بر اساس نتایج پروتئومیکس و تعیین محتوای ژنی سویه‌ی IE-1، هر دو پروتئین *Cry1Ag* و *Cry1Aa* در این سویه از باکتری Bt، وجود دارد. در نتیجه، این احتمال وجود دارد، که به دلیل شباهت زیاد توالی نوکلئوتیدی این دو ژن، در طی تکثیر ژن *cryIAG*، در سویه‌ی IE-1، به‌طور هم‌زمان ژن *cryIAa* نیز تکثیر می‌شود. برای بررسی این مسئله، از آنزیم‌های برشی اختصاصی برای هر ژن، برای برش محصولات PCR استفاده گردید. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، آنزیم‌های برشی انتخابی، برای ژن *cryIAa1* آنزیم *SacI* و برای ژن *cryIAG1* آنزیم *SmaI* بود. پس از تکثیر بخش‌هایی از ژن که محل برش آنزیم‌های برشی در آن‌ها وجود داشت (شکل ۳-۸، تصویر A)، محصولات PCR، با آنزیم‌های *SmaI* و *SacI* برش داده شدند. در این بخش از سویه‌ی HD-1، به‌عنوان شاهد برای ژن *cryIAa*، نیز استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۳-۸ تصویر B، مشخص است، پس از برش محصولات PCR، با آنزیم اختصاصی ژن *cryIAG*، *SmaI*، هیچ قطعه‌ای حاصل نشد. به این مفهوم که، ژن *cryIAG* در محصولات PCR وجود ندارد و تنها ژن *cryIAa* تکثیر شده است. اما، قطعه‌ی تکثیر شده در PCR، به درستی با آنزیم برشی انتخابی ژن *cryIAa*، *SacI*، برش یافت و دو قطعه با اندازه‌های ۵۲۴ و ۶۶۹ جفت‌باز حاصل در ژل رؤیت گردید. برش وکتور pET30a توسط آنزیم‌های برشی، صحت کارایی آنزیم‌های مورد استفاده را نشان می‌دهد.

با هم‌ترازی دو ژن *cryIAa* و *cryIAG* و یافتن نواحی متفاوت ژن، اقدام به طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن *cryIAG* شد. بر اساس نتایج PCR، هیچ قطعه‌ای با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cryIAG* در ژنوم سویه‌ی IE-1، تکثیر نشد. نتیجه نهایی آنکه، سویه‌ی IE-1، فاقد ژن *cryIAG* می‌باشد و دلیل گزارش کردن این پروتئین در داده‌های پروتئومیکس به دلیل شناسایی مثبت کاذب^۱ پروتئین *Cry1Ag*، که در مورد پروتئین‌های *Cry* که شباهت زیادی دارند، اشتباهی رایج می‌باشد، بوده است. ترکیب پروتئین‌های موجود کریستال‌های حل شده‌ی سویه‌ی IE-1، دو مرتبه‌ی دیگر نیز به روش LC-MS/MS، آنالیز شدند و هر بار

^۱ False-positive identification

پروتئين Cry1Ag در فهرست پروتئينى هاى موجود در كريستال، يافت گرديد. اما در دو تكرار آخر، هيچ پپتيد اختصاصى منسوب به پروتئين Cry1Ag، يافت نگرديد.



شكل ۳-۸- برش محصولات PCR تكثير ژن *cryIAg* با آنزيم‌هاى برشى اختصاصى. تصوير A؛ محصولات PCR تكثير بخشى از ژن *cryIAg* و تصوير B؛ برش محصولات PCR با استفاده از آنزيم‌هاى برشى *SmaI* و *SacI* را نشان مى‌دهد. شماره‌هاى يك؛ وكتور pET30a هضم نشده، شماره‌هاى دو؛ وكتور pET30a هضم شده با آنزيم برشى مشخص شده، شماره‌هاى سه؛ محصول PCR سويهى HD-1 هضم نشده، شماره‌هاى چهار؛ محصول PCR سويهى HD-1 هضم شده، شماره‌هاى پنج؛ محصول PCR سويهى IE-1 هضم نشده و شماره‌هاى شش؛ محصول PCR سويهى IE-1 هضم شده، را نشان مى‌دهند.

۳-۲-۳- ژن‌هاى *cryIHa*، *cryIHb*، *cryIG* و *cryIAd*

با توجه به مشكلات پيش آمده براى يافتن ژن *cryIAg*، در مورد ژن‌هاى كانديد *cryIHa*، *cryIHb*

و *cryIAd*، ابتدا فهرست پپتيدهاى اختصاصى براى هر پروتئين تهيه (جدول ۳-۲۷) گشت.

جدول ۳-۲۷- اطلاعات مربوط به پروتئین های کاندید برای همسانسازی.

Bt strain	Peptide (95%)	Specific peptide ¹	Accession number	Protein name	Contribution value	Coverage%
IP-2	256	20	sp Q45748	Pesticidal crystal protein Cry1Ha	18.79	32.51
IE-1	102	12	sp Q45718	Pesticidal crystal protein Cry1Hb	11.56	21.99
IE-1	272	29	sp Q03744	Pesticidal crystal protein Cry1Ad	28.08	60.22
IEp	281	3	sp Q9ZAZ6	Pesticidal crystal protein Cry1Gb	6	33.19

(۱) تعداد پپتیدهایی که به صورت اختصاصی، به تنها به یک پروتئین منسوب شده اند.

سپس، با توجه به محل قرارگیری پپتیدهای شناسایی شده، روی ژن مدنظر، توالی اسیدهای آمینه به توالی نوکلئوتیدی برگردانده و آغازگرهای دژنره طراحی گردید.

نتیجه آنکه، با انجام واکنش های زنجیره ای پلی مرز، هیچ قطعه ای از ژن های مورد نظر تکثیر نشد. زیرا، اشتباهی مشابه پروتئین Cry1Ag، در مورد ژن های *cry1Ha*، *cry1Hb*، *cry1G* و *cry1Ad* نیز رخ داده بود. در نتیجه، در گزارش پروتئین های موجود در کریستال سویه های باکتری Bt، مورد مطالعه، تجدید نظر شد. در نهایت تصمیم بر آن شد که، تجزیه و تحلیل داده های پروتئومیکس بر اساس معیارهای جدیدی انجام گیرد. معیارهای اتخاذ شده به این قرار می باشند:

۱- Unused value: ارزشی است که به پپتیدهای شناسایی شده برای یک پروتئین داده می شود، به این مفهوم که این پپتیدها تنها با پروتئین گزارش شده، هم خوانی دارند. هر چقدر این ارزش عدد بزرگتری باشد، تعداد پپتیدهای اختصاصی شناسایی شده برای آن پروتئین، بیشتر و نتیجه قابل اعتمادتر است.

۲- Contribution value: ارزش مشارکت برای هر پپتید با طول بیش از شش اسید آمینه، مقداری بین صفر تا دو، می باشد. اگر پپتیدی ارزش مشارکتی برابر با دو داشته باشد به این مفهوم است که با حدود

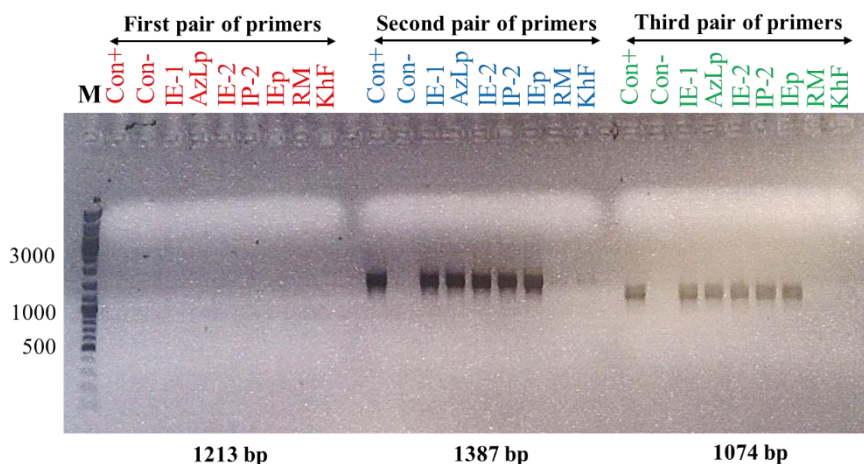
اطمینان بالای ۹۹ درصد با پروتئین گزارش شده همخوانی دارد. مجموع ارزش های مشارکت پپتیدهای اختصاصی شناسایی شده برای هر پروتئین، به صورت unused value تعریف و گزارش می شود.

۳- Rank: رتبه ی پروتئین شناسایی شده در فهرست پروتئین های یافت شده در کریستال های باکتری Bt، اهمیت دارد. هر چقدر پروتئین شناسایی شده، رتبه ی بالاتری (رتبه ی یک، بالاترین رتبه می باشد) داشته باشد، تعداد پپتیدهای بیشتری برای آن پروتئین در کریستال باکتری Bt، یافت شده است که به نوعی منعکس کننده ی فراوانی نسبی آن پروتئین در میان پروتئین های گزارش شده، می باشد.

۴- NCBI: محل قرارگیری پپتیدهای منسوب به هر پروتئین، باید در بانک ژن NCBI مورد بررسی قرار بگیرد. اگر پپتیدهای شناسایی شده در قسمت حفاظت شده ژن های cry قرار گرفته باشند، نتیجه قابل اعتماد نیست.

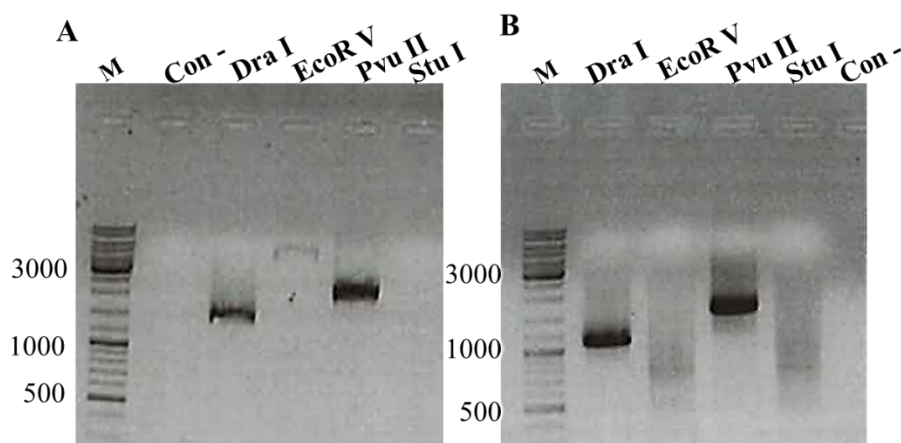
۳-۳-۳- ژن cryIIa

بر اساس نتایج به دست آمده از تعیین محتوای ژنی سویه های Bt، تنها ژن کاندید باقی مانده برای همسانه سازی، ژن cryII بود. ژن cryII در پنج سویه ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEp باکتری Bt وجود داشت. در قدم نیاز بود، توالی کامل ژن cryII، تعیین و ژن به طور کامل شناسایی گردد. نتایج تکثیر ژن cryII با استفاده از سه جفت آغازگر در شکل ۳-۹، آمده است.



شکل ۳-۹- تکثیر ژن cryII با سه جفت آغازگر.

همان طور که در شکل بالا، مشخص است، هیچ قطعه‌ای از قسمت ۵ ژن، تکثیر نشده است. در نتیجه، مشابه ژن *cryIAg*، با استفاده از تکنیک راه ژنگان پیمایی، قسمت ابتدایی ژن نیز تکثیر گردید (شکل ۳-۱۰). قطعات تکثیر شده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز اول و دوم، در کتابخانه‌های ژنومی *DraI* و *PvuII*، توالی‌یابی گردید. توالی اجماع به دست آمده، ۳۱۶۲ جفت‌باز طول دارد، که پس از ثبت توالی نوکلئوتیدی کل ژن، در بانک ژن NCBI، با شماره دستیابی MG584186، توسط Prof. Neil Crickmore، نام‌گذاری و در وبسایت <http://www.btnomenclature.info> ثبت گردید و پروتئین *CryIIa38* نام گرفت.

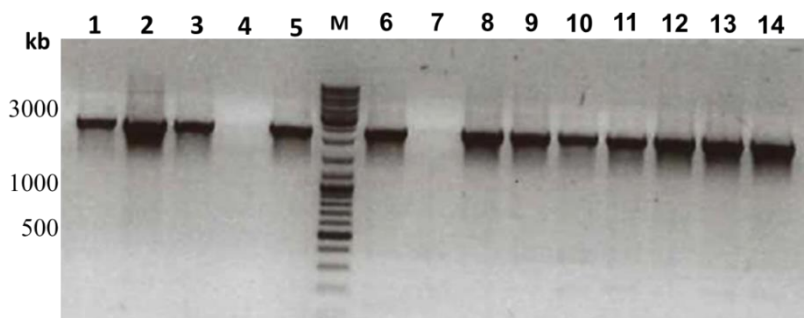


شکل ۳-۱۰ - نتیجه‌ی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز اول (A) و دوم (B) برای تکثیر ژن *cryII* در تکنیک راه ژنگان پیمایی. حرف M؛ نشان دهنده‌ی مارکر، con-؛ شاهد منفی که به جای کتابخانه‌ی ژنومی از آب استفاده شده است، *DraI*، *EcoRV*، *PvuII* و *StuI*؛ کتابخانه‌های ژنومی تهیه شده، می‌باشد.

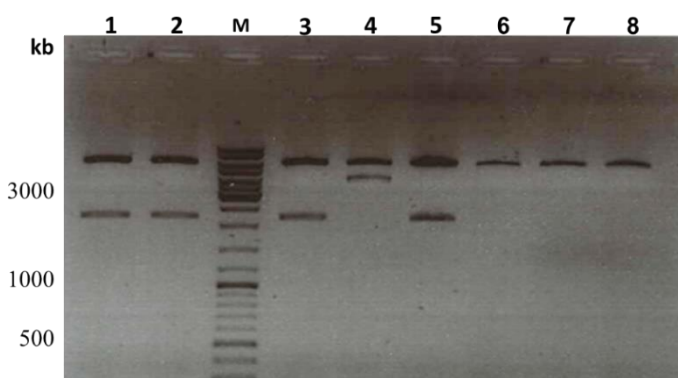
۳-۴- همسانسازی ژن *cryIIa38*

آغازگرهای مورد استفاده برای همسانسازی ژن *cryIIa38*، قطعه‌ای با اندازه‌ی ۲۱۱۲ جفت‌باز از ناحیه کدشونده ژن، تکثیر کردند. قبل از انجام مرحله‌ی الحاق در همسانسازی ژن *cryIIa38*، تمامی اجزای مورد استفاده، روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شدند. سپس، مرحله‌ی الحاق انجام گرفت و وکتورهای نوترکیب به سلول‌های مستعد BL21 از باکتری *E. coli*، منتقل شدند. تأیید همسانسازی موفق، از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز کلنی‌های باکتریایی رشد کرده روی محیط جامد LB (شکل ۳-۱۱) و هضم دوتایی پلاسمید نوترکیب استخراج شده از باکتری BL21، انجام گرفت (شکل ۳-۱۲). بدین منظور، ۲۲ عدد کلنی باکتریایی به

صورت تصادفي انتخاب، و در ۱۴ كلني، با انجام واكنش زنجيره اي پلي مرز با استفاده از آغازگرهاي قطعه ي همسانه سازي شده، وجود ژن هدف در وكتور نوتركيب، آزمون شد. نتايج حاكي از آن بود كه، از ۱۴ كلني مورد بررسي، در ۱۲ مورد ژن مورد نظر به درستي همسانه سازي شده است.



شكل ۳- ۱۱- نتيجه تكثير ژن همسانه سازي شده در وكتور نوتركيب pET30a-CryIIa38. حرف M؛ نشان دهنده ي ماركر مولكولي و شماره هاي مشخص شده؛ كلني هاي مورد بررسي از باكتري *E. coli* مي باشد. در هشت كلني باكتريايي ديگر، با روش هضم دوتايي همسانه سازي شدن قطعه ي ژني مورد نظر بررسي گرديد (شكل ۳-۱۲). بر اساس نتايج به دست آمده از هضم دوتايي وكتورهاي نوتركيب، همسانه سازي در چهار كلني باكتري *E. coli* به درستي صورت پذيرفته بود، كه در آن ها دو بانده متناظر با اندازه هاي وكتور خطي شده و ژن *cryIIa38* مشاهده گرديد.

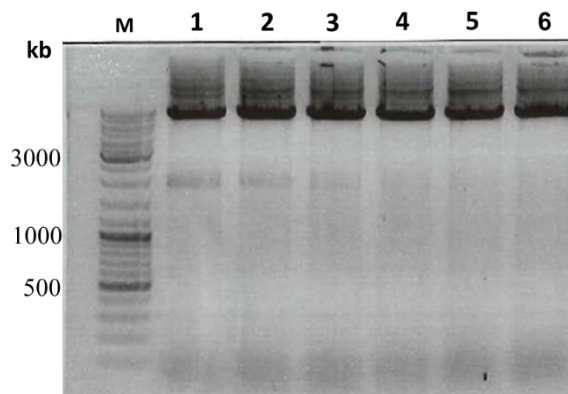


شكل ۳- ۱۲- بررسي صحت همسانه سازي ژن *cryIIa38* در وكتورهاي نوتركيب pET30a-CryIIa38 به روش هضم دوتايي. حرف M؛ نشان دهنده ي ماركر مولكولي و شماره هاي مشخص شده؛ كلني هاي مورد بررسي از باكتري *E. coli* مي باشد.

پلاسمید مربوط به سه کلنی باکتریایی مثبت، برای تعیین توالی با سه آغازگر (آغازگرهای پیش رو و معکوس قطعه ژن و پیش رو وکتور)، به شرکت StabVida ارسال گشت. نتایج توالی یابی نشان داد که، ژن همسانسازی شده در نوکلئوتید شماره ۳۴۶، قرار گرفته در دومین I، با ژن *cryIIa38* تفاوت دارد، به این ترتیب که، به جای نوکلئوتید آدنین، نوکلئوتید گوانین وجود دارد. این تفاوت منجر به تغییر اسیدآمینهای ایزولوسین به والین می شود. در نتیجه، با استفاده از تکنیک جهش زایی هدفمند، نوکلئوتید آدنین باید جایگزین نوکلئوتید گوانین شود.

۳-۴-۱- جهش زایی هدفمند

تغییر توالی نوکلئوتیدی ژن همسانسازی شده، با روش جهش زایی هدفمند بر مبنای واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام گرفت. در این روش، تغییر نوکلئوتید با انجام یک PCR با استفاده از آغازگری که جهش مورد نظر در آن وارد شده بود، صورت پذیرفت. نتیجه ی PCR گردیانت در شکل ۳-۱۳ آمده است، که برای شش دمای اتصال متفاوت مورد استفاده، جواب مثبت داده و وکتور نو ترکیب، به طور کامل تکثیر شده است.



شکل ۳-۱۳ - تکثیر وکتور نو ترکیب pET30a-CryIIa38 برای تغییر توالی نوکلئوتیدی ژن همسانسازی شده، با روش جهش زایی هدفمند. حرف M؛ نشان دهنده ی مارکر مولکولی و شماره های مشخص شده؛ دمای اتصال متفاوت، که به ترتیب ۴/۴۵، ۴۸، ۵۰/۷، ۵۳/۵، ۵۶، ۵۸/۱ و ۵۹/۸ درجه سلسیوس، می باشد.

پس از انتقال وکتورهای نو ترکیب تکثیر شده به سلول های مستعد، با روش هضم دوتایی، موفقیت همسانسازی و انتقال مورد بررسی قرار گرفت.

شش وکتور نو ترکیب، برای تعیین توالی به شرکت StabVida ارسال شدند. توالی قطعه ژن همسانه- سازی شده با استفاده از سه آغازگر؛ پیش رو، معکوس و میانی، تعیین گشت. نتایج حاکی از آن بود که، که در هر شش وکتور نو ترکیب تهیه شده، جایگزینی نوکلئوتید به درستی انجام گرفته و نوکلئوتید آدنین جایگزین گوانین شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده در فصل سوم این رساله، ژن جدیدی در سویه ی Bt IE-1 یافت شد و بر اساس نظر کمیته نام گذاری توکسین های باکتری Bt، *cryIIa38* نام گرفت. ژن *cryIIa38* با موفقیت همسانه سازی شد. همچنین موتانتی از این ژن با تفاوت یک نوکلئوتید در موقعیت ۳۴۸ واقع در دومین I، به نام *cryIIa38-II16V* حاصل آمد. با توجه به ویژگی های منحصر به فرد توکسین های خانواده ی CryII از جمله فعالیت دوگانه روی آفات بالپولکدار و سخت بالپوش، این سؤال مطرح شد که آیا توکسین جدید **CryIIa38 فعالیت حشره کشی و سلول کشی روی آفات بالپولکدار دارد؟** همچنین در مورد موتانت *CryIIa38-II16V* این پرسش پیش آمد که آیا تغییر در یک اسید آمینه، روی زهراگینی تیپ وحشی این پروتئین اثر می گذارد؟ به عبارتی با توجه به وجود تفاوت تنها در یک اسید آمینه در پروتئین *CryIIa38* و موتانت *CryIIa38-II16V*، آیا ویژگی های ساختاری و زهراگینی این دو توکسین نیز متفاوت می شود؟ و در نهایت اینکه آیا شباهتی بین ساختار و فعالیت حشره کشی و سلول کشی دو توکسین *CryIIa38* و *CryIIa38-II16V*، با توکسین مشابه دیگری از گروه پروتئین های CryII، به نام **CryIIa7 وجود دارد؟** برای یافتن پاسخ به پرسش های مطرح شده، آزمایش های فصل بعد طراحی و اجرا شدند.

فصل چهارم

مقایسه ساختار و فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی
پروتئین‌های Cry1Ia

فصل چهارم: مقایسه ساختار و فعالیت حشره کشی و سلول کشی پروتئین های Cry1Ia

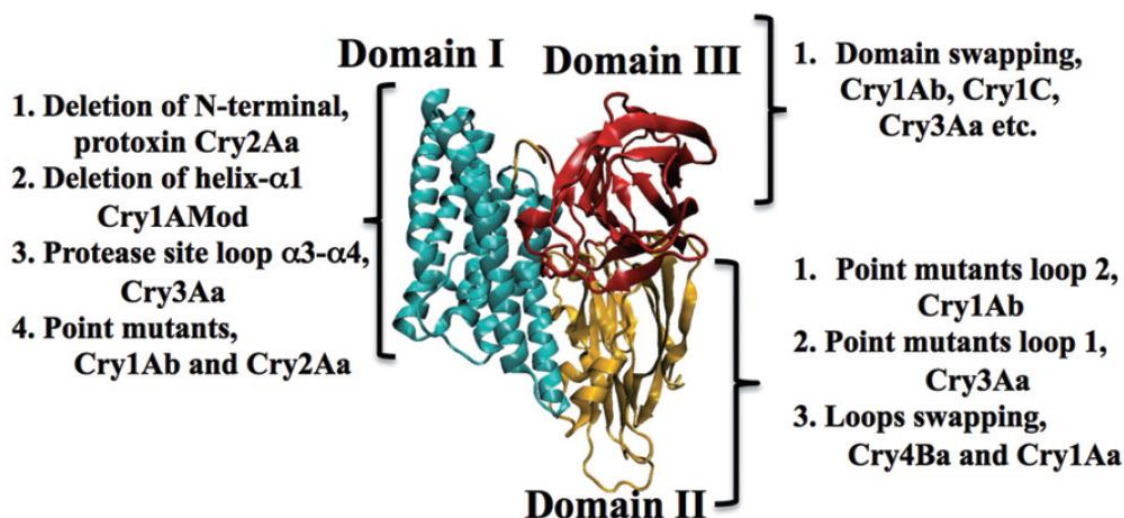
۴-۱- مقدمه

پس از همسانه سازی ژن *cryIIa38*، پروتئین مربوطه بیان، استخراج و خالص سازی گردید. همچنین، ژن *cryIIa7* موجود در یک سویه ی اسپانیایی از باکتری Bt، HU4-2 که پیش تر توسط Ruiz de Escudero و همکاران (۲۰۰۶) همسانه سازی شده بود، بیان و پروتئین استحصال شده، استخراج و خالص سازی شد. به دلیل همولوژی ۹۶ درصدی توالی اسید آمینه های دو پروتئین *Cry1Ia7* و *Cry1Ia38*، از توکسین *Cry1Ia7* نیز در این رساله بهره جسته شد، تا بررسی شود که آیا تفاوت اندک در توالی اسیدهای آمینه، منجر به تغییر فعالیت حشره کشی توکسین می شود. به علاوه، پروتئین موتانت به دست آمده از ژن *cryIIa38-III16V*، که تنها یک اسید آمینه با ژن تیپ وحشی تفاوت دارد نیز، بیان، استخراج و خالص سازی شد. در نتیجه در این رساله، سه پروتئین *Cry1Ia38*، *Cry1Ia38-III16V* و *Cry1Ia7*، از لحاظ ساختار، فعالیت حشره کشی و سلول کشی مورد مقایسه قرار گرفتند.

برای درک بهتر نحوه ی عملکرد توکسین های Bt به دست آوردن اطلاعات تکمیلی از اهمیت هر یک از مراحل بیماری زایی؛ اتصال توکسین به گیرنده، تشکیل ساختارهای الیگومری، ایجاد منفذ، و نقش هر یک از گیرنده های پروتئینی، از روش های مختلف جهش نقطه ای به منظور تغییر بخشی از ساختار توکسین، به صورت حذف، اضافه و یا جایگزینی یک اسید آمینه استفاده می کنند. همچنین، گاهی بخشی از ساختار توکسین Bt حذف می شود (Ocelotl et al., 2015) تا عملکرد توکسین تغییر یافته بررسی و نقش قسمت حذف شده، تعیین گردد. در شکل ۴-۱، خلاصه ای از جهش های مورد بررسی، اهمیت و نقش هر کدام در نحوه ی عملکرد توکسین *Cry1Ia* و فعالیت حشره کشی آن، نمایش داده شده است.

بر اساس نتایج پژوهش های صورت گرفته، با تغییر لوپ های دومین II، می توان تخصص میزبانی توکسین های *Cry* را تغییر داد و یا بهبود بخشید. همچنین، جهش های نقطه ای که در توالی های لوپ دومین II رخ می دهد در بسیاری از موارد منجر به معرفی موتانتی با افزایش فعالیت حشره کشی شده است. جهش نقطه ای N372A، در لوپ دو توکسین *Cry1Ab*، و جهش سه تایی N372A، A282G و L283S در همین لوپ، باعث

افزایش به ترتیب ۸ و ۳۶ برابری زهرآگینی این توکسین نسبت به لاروهای *L. dispar* شده است. نکته جالب توجه آنکه، افزایش فعالیت حشره کشی با افزایش تمایل اتصال توکسین به سلول های پوششی روده ی میانی لاروهای *L. dispar* هم بستگی مثبت و مستقیم دارد (Rajamohan et al., 1996).



شکل ۴-۱- ساختار سه بعدی توکسین Cry1Aa با تمرکز بر نقاطی که ایجاد تغییر در آنها باعث افزایش فعالیت حشره کشی در توکسین های Cry مختلف می شود (Bravo et al., 2013).

هم چنین نشان داده شده است که جهش در نواحی لوپ های دومین II در توکسین Cry3Aa سخت-بالپوشان منجر به افزایش زهرآگینی در برابر *Tenebrio molitor* می شود (Wu et al., 2000). جهش سه تایی Y351F و Y350F، R345 در لوپ یک دومین II، زهرآگینی این موتانت را در برابر *T. molitor* و سوسک کلرادوی سیب زمینی نسبت به Cry3Aa به ترتیب ده و سه برابر کرد (Wu et al., 2000). این نتایج نشان می دهند که نواحی لوپی دومین II، نواحی اساسی در اتصال توکسین های Cry و نقاط هدف مناسبی برای جهش-زایی هستند. اما در مورد دومین III، مثال های محدودی از بروز جهش در لوپ های در معرض وجود دارد که تنها در برخی از آنها موتانت هایی یافت شده است که افزایش زهرآگینی نسبت به آفت هدف، غیر معنی دار بوده است (Bravo et al., 2013).

مشخص شده است که نواحی از لوپ های در معرض دومین II نقشی تعیین کننده در تخصص میزبانی توکسین های Cry دارند (Bravo et al., 2005). توکسین Cry4Ba خاصیت زهرآگینی در مقابل پشه های *Culex sp.* ندارد در حالی که توکسین Cry4Aa برای تمامی پشه ها زهرآگین است (Abdullah et al., 2003). توالی اسیدهای آمینه لوپ سه دومین II توکسین Cry4Aa، به لوپ سه دومین II توکسین Cry4Ba وارد شده است، نتایج حاکی از آن است که نه تنها موتانت جدید (4BL3GAV) فعالیت حشره کشی خود را در برابر *Aedes aegypti* حفظ کرده است، بلکه برای پشه های *Culex sp.* نیز زهرآگین می باشد (Abdullah et al., 2003). در راستای همین اندیشه، نواحی لوپ دومین II توکسین Cry1Aa مهندسی شد تا تقلیدی از موتانت 4BLGAV توکسین Cry4Ba باشد، نتایج نشان داد که توکسین مهندسی شده Cry1Aa برای لاروهای *C. pipiens* زهرآگین است، گرچه فعالیت آن سه برابر کمتر از موتانت 4BLGAV است (Liu and Dean, 2006).

درمورد توکسین Cry2Aa دو تغییر در دومین I، موتانتی ایجاد کرده که چهار تا شش برابر زهرآگینی بیشتری نسبت به *S. litura*، *H. armigera* و *Agrotis ipsilon* دارد (Mandal et al., 2007). اولین تغییری که سمیت Cry2Aa را سه برابر کرد، شامل حذف ۴۲ اسیدآمینه از انتهای آمینی این توکسین بود. ساختار سه بعدی توکسین Cry2Aa نشان داد که این ۴۹ اسیدآمینه، ماریچ آلفای یک را در دومین I، تشکیل می دهند که معمولاً در طی فعال سازی پروتئازی پیش توکسین Cry2Ab، شکسته می شود. مشخص شده است که این قطعه حذف شده، بخش آمینی دومین II را مسدود می کند و در برهم کنش با گیرنده نقش دارد. دو جهش نقطه ای دیگر در زنجیره آلفای یک دومین I، K63F و K64P در توکسین Cry2Aa وارد شده است که باعث افزایش ذات آبگریزی بخش بین غشایی این توکسین شده است (Mandal et al., 2007).

به غیر از جهش هایی هدفمند در دومین I به منظور وارد کردن مکان هایی برای برش پروتئازی، دو تغییر دیگر در دومین I توکسین های Cry1Ab و Cry2Aa نشان داده شده است که منجر به افزایش فعالیت حشره کشی می شود. موتانت V171C توکسین Cry1Ac فعالیت حشره کشی ۲۵ برابر بیشتر نسبت به تیپ وحشی خود، در برابر *Lymantria dispar*، دارد در حالی که زهرآگینی خود را نسبت به کرم شاخدار تنباکو حفظ کرده است (Alzate et al., 2010).

افزایش سه برابری فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry3Aa در برابر سوسک *Anoplophora glabripennis* از خانواده‌ی Cerambycidae، با امتزاج هشت اسیدآمینه که به طور اختصاصی به سلولاز روده میانی متصل می‌شوند، حاصل شده است (Guo et al., 2012).

با این فرض که فعالیت حشره‌کشی توکسین‌های Cry1Ia38، Cry1Ia38-II16V و Cry1Ia7 متفاوت می‌باشد، آزمایش‌های این فصل از رساله طراحی و انجام گردید.

۲-۴- مواد و روش‌ها

۱-۲-۴- بیان پروتئین Cry1Ia38

بیان پروتئین Cry1Ia38 در سلول‌های نوترکیب *E. coli* BL21، بر اساس پژوهش Ruiz de Escudero و همکاران (۲۰۰۶)، با کمی تغییرات انجام شد. روش کار به این ترتیب بود که ابتدا با برداشتن یک تک کلنی از باکتری *E. coli* رشد کرده روی محیط کشت جامد LB، و تلقیح ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین^۱ با غلظت ۵۰ mg/ml، پیش‌کشت تهیه و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه نگهداری شد. سپس، کشت نهایی در محیط 2xTY (حاوی ۱۶ گرم تریپتون^۲، ۱۰ گرم عصاره‌ی مخمر^۳ و پنج گرم سدیم کلراید^۴ در یک لیتر آب) انجام گرفت. دو لیتر محیط کشت 2xTY با ۲۰ میلی‌لیتر از پیش‌کشت تلقیح و آنتی‌بیوتیک کانامایسین به آن اضافه شد. کشت نهایی تهیه شده به مدت چهار ساعت روی شیکر با دور دور در دقیقه ۱۸۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا جذب نوری (OD₆₀₀) توسط محیط کشتی که در آن باکتری رشد کرده است، به حدود ۰/۵ تا ۰/۶ برسد. بعد از رسیدن OD₆₀₀ به مقدار مورد نظر، محیط کشت تلقیح شده به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۸۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. سپس، برای افزایش بیان پروتئین IPTG^۵ با غلظت یک میلی‌مولار به محیط کشت اضافه گردید. محیط کشت حاوی IPTG به مدت دو ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۸۰ دور در

¹ Kanamycin

² Trypton

³ Yeast extract

⁴ NaCl

⁵ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

دقیقه نگه داشته شد. در ادامه، یک لیتر بافر فسفات نمکی 1×10^8 سرد (پیشتر در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده بود)، به محیط کشت اضافه گشت. سپس، با سانتریفیوژ محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۸۰۰۰ دور در دقیقه محیط کشت از سلول های باکتری جدا گردید. روشین که حاوی محیط کشت بود، دور ریخته شد و ته نشین به لوله فالكونی که از قبل وزن خالی آن اندازه گرفته شده بود، منتقل و وزن ته نشین محاسبه و ثبت گردید. ته نشین به دست آمده، به مدت یک شب در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه داشته شد.

۴-۲-۲- استخراج و خالص سازی پروتئین Cry1Ia38

برای استخراج پروتئین بیان شده، سلول های باکتری به روش آنزیمی و مکانیکی تخریب شدند. هر یک گرم از ته نشین حاوی سلول های باکتری با ده میلی لیتر بافر اتصال^۱ (ایمیدازول ۴۰ میلی مولار، سدیم کلراید ۴ مولار، Tris-HCl ۱۶۰ میلی مولار، pH ۷/۹) مخلوط شدند. هضم آنزیمی سلول های باکتری، با استفاده از آنزیم لیزوزیم انجام گرفت. به این صورت که، غلظت ۰/۲ mg/ml از آنزیم لیزوزیم، ۲۰ μg/ml از DNase و یک میلی مولار از فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF)، با هر گرم از ته نشین، مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط با شیکر ۶۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. سپس، تخریب مکانیکی سلول های باکتری، به وسیله امواج صوتی^۲، در ده چرخه، ۶۰ ثانیه ای، با ۶۰ ثانیه استراحت در حد فاصل چرخه ها، صورت گرفت. بعد تخریب آنزیمی و مکانیکی سلول های باکتری، پروتئین بیان شده، با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس با دور $16000 \times g$ ، از سلول های باکتریایی و مابقی ذرات سلولی جدا شدند. روشین به دست آمده که حاوی پروتئین Cry1Ia38 می باشد، به لوله فالكون استریلی روی یخ منتقل و ته نشین در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. با توجه به اینکه پروتئین Cry1Ia38 برچسب هیستیدین دارد، جدا کردن و خالص سازی این پروتئین از مابقی پروتئین های موجود در روشین، با استفاده از ستون خالص سازی HisTrapTM FF Crude column^۴ صورت گرفت. خالص سازی پروتئین در ستون HisTrap با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب که، ستون HisTrap یک میلی لیتری، ابتدا با پنج میلی لیتر آب مقطر استریل (پنج حجم از حجم ستون) و

¹ Phosphate Buffer Saline (PBS)

² Binding buffer

³ Sonication

⁴ GE Healthcare BioScience, Uppsala, Sweden

سپس با پنج ملی لیتر از بافر اتصال، شست و شو داده شد. سرعت جریان مایع در ستون در هنگام شست و شو و موازنه روی ۱ ml/min تنظیم گشت. بعد از اتمام شست و شو، محلول پروتئینی از ستون با سرعت ۰/۸ ml/min عبور داده شد. آنچه که از ستون خارج شد^۱، درون یک ظرف تمیز روی یخ، جمع آوری شد. سپس، ستون با ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر از بافر اتصال شست و شو داده شد. برای جداسازی پروتئین های CryIIa38 با برچسب هیستیدین، ۱۰ میلی لیتر از بافر استخراج^۲ (بافر فسفات نمکی 1X، ایمیدازول ۵۰۰ میلی مولار، pH ۷/۴) از ستون عبور داده شد. آنچه در این مرحله از ستون خارج می گردد، پروتئین مدنظر می باشد، در نتیجه خروجی ستون در ده میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری (در هر تیوب، یک میلی لیتر) جمع آوری شد. غلظت پروتئین موجود در هر تیوب با نانودراپ در طول موج ۲۸۰ نانومتر، تعیین شد. محلول پروتئینی عبور کرده از ستون و خالص شده، برای تعویض بافر استخراج با بافر کربنات ۵۰ میلی مولار (Na₂CO₃)، با pH ۱۰/۵، دیالیز گشت. برای دیالیز پروتئین CryIIa38، محلول پروتئینی در یک غشای با خاصیت نفوذ تراوایی (SnakeSkin™ Dialysis tubing^۳) ریخته به مدت یک شب در بافر کربنات، دمای چهار درجه سلسیوس روی شیکر با ۳۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. پروتئین دیالیز شده، به مدت ده دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ ×g در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. روشنشین به لوله ی فالكون تمیزی منتقل و ته نشین حذف گردید. غلظت پروتئین به روش بردفورد (۱۹۷۶) تعیین شد.

۴-۲-۳- فعال کردن پیش توکسین CryIIa38 به وسیله تریپسین

برای تبدیل پیش توکسین CryIIa38 به توکسین فعال، از آنزیم تریپسین به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/وزنی) استفاده گردید. به این ترتیب که، ده میلی گرم از پیش توکسین CryIIa38 با یک میلی گرم از آنزیم تریپسین مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته شد. سپس، توکسین فعال شده، به مدت ده دقیقه، با دور ۱۶۰۰۰ ×g در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. روشنشین بعد از انتقال به میکروتیوب تمیز، با روش بردفورد تعیین غلظت شد. پروفایل مربوط به پیش توکسین و توکسین فعال شده CryIIa38، روی ژل SDS-PAGE دوازده درصد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از جداسازی پروتئین CryIIa38 روی ژل، غلظت

¹ Flow through

² Elution buffer

³ Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

توکسین فعال شده، با روش چگالی سنجی، در نرم افزار TotalLab Quant (version 12.3) و با استفاده از چهار غلظت مختلف از سرم آلبومین گاوی مربوط به عنوان پروتئین استاندارد، تعیین غلظت شد.

۴-۲-۴- بررسی اثر زهرآگینی پروتئین Cry1Ia38

فعالیت حشره کشی و سلول کشی پیش توکسین و توکسین فعال شده ی Cry1Ia38، روی لاروهای *O. nubilalis*، *S. exigua*، *G. molesta*، *S. littoralis* و *H. armigera* و سلول های Sf21 ارزیابی شد.

۴-۲-۴-۱- زیست سنجی

تک غلظت 1000 ng/cm^2 از پیش توکسین و توکسین فعال شده ی Cry1Ia38، تهیه و برای زیست-سنجی به روش آلوده سازی سطح ماده ی غذایی، مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت حشره کشی و خاصیت بازدارندگی رشدی^۱ پروتئین Cry1Ia38 روی لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *S. exigua*، *G. molesta*، *S. littoralis* و *H. armigera* بررسی گردید. آزمایش های زیست سنجی سه مرتبه تکرار و در هر تکرار از ۴۸ لارو سن یک استفاده شد. سطح غذای مصنوعی لاروها در شاهد به بافر کرینات ۵۰ میلی مولار با pH ۱۰/۵ آغشته شد. ظروف زیست سنجی در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/هشت ساعت تاریکی نگه داشته شدند. تعداد لاروهای مرده و لاروهایی که در مرحله ی سن یک لاروی باقی مانده بودند، بعد از هفت و ده روز ثبت گردید.

۴-۲-۴-۲- آزمون زنده مانی سلول

فعالیت سلول کشی پیش توکسین و توکسین فعال شده ی پروتئین Cry1Ia38، به روش درصد زنده مانی سلول ها، همان طور که پیشتر در بند ۲-۲-۲-۱۶-۲ توضیح داده شده است، روی سلول های Sf21 انجام گرفت. ده میکرولیتر از غلظت های متفاوت پیش توکسین و توکسین فعال شده ی پروتئین Cry1Ia38 (20 ، 40 ، 80 ، 160 و 320 $\mu\text{g/ml}$) به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای که حاوی 2×10^6 سلول/میلی لیتر بودند، اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول های Sf21، با افزودن $20 \mu\text{l}$ از معرف CellTiter 96® Aqueous One Solution، با افزودن $20 \mu\text{l}$ از معرف CellTiter 96® Aqueous One Solution، به هر چاهک، تعداد سلول های زنده از طریق اندازه گیری میزان جذب در طول 490 نانومتر در دستگاه

^۱ Growth inhibition

اسپکتروفوتومتر تعیین گشت. تغییرات ریخت سناختی حاصل از اثر پروتئین Cry1Ia38 روی سلول های Sf21، نیز بعد از ۲۴ ساعت ثبت گردید.

۴-۲-۵- بیان، استخراج، خالص سازی و فعال کردن موتانت Cry1Ia38-I116V

برای پاسخ دادن به این سوال، که آیا تفاوت در یک اسید آمینه در توالی اسیدهای آمینه ی پروتئین Cry1Ia38 باعث بروز تفاوت در دامنه ی فعالیت حشره کشی موتانت می شود یا خیر، موتانت Cry1Ia38-I116V بیان و پروتئین حاصل از آن استخراج و خالص سازی شد. بیان، استخراج، خالص سازی و فعال کردن موتانت Cry1Ia38، مطابق آنچه پیشتر در مورد پروتئین Cry1Ia38 توضیح داده شده است، انجام گرفت.

۴-۲-۶- بررسی اثر زهر آگینی موتانت Cry1Ia38-I116V

دامنه ی فعالیت حشره کشی موتانت Cry1Ia38، روی لاروهای *O. nubilalis*، *G. molesta*، *S. littoralis* و *exigua* و فعالیت سلول کشی موتانت Cry1Ia38، روی سلول های Sf21 و Hi5 مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۲-۶-۱- زیست سنجی

خاصیت زهر آگینی و بازدارندگی رشدی دو غلظت 1000 و 100 ng/cm² از توکسین فعال شده ی موتانت Cry1Ia38، روی لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *G. molesta*، *S. littoralis* و *exigua* به روش آلوده سازی سطح ماده ی غذایی، مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حشره کشی پیش توکسین موتانت Cry1Ia38-I116V روی لاروهای سن یک *G. molesta* و *S. littoralis* بررسی گردید. آزمایش های زیست سنجی در سه تکرار انجام و در هر تکرار از ۴۸ لارو سن یک استفاده شد. روش انجام آزمایش های زیست سنجی مطابق قسمت پیشین انجام گرفت.

۴-۲-۶-۲- آزمون زنده مانی سلول

فعالیت سلول کشی توکسین فعال شده ی موتانت Cry1Ia38-I116V، به روش درصد زنده مانی سلول ها، مطابق بخش قبلی، سلول های Sf21 و Hi5 بررسی گشت. به این ترتیب که، سلول های Sf21 و Hi5 با غلظت

2×10^6 سلول/میلی لیتر، با ده میکرولیتر از غلظت های 20 ، 4 ، 0.8 و 0.16 توکسین فعال شده ی موتانت Cry1Ia38، تیمار شدند. درصد سلول های زنده ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار شدن، با افزودن $20 \mu\text{l}$ از معرف CellTiter 96® Aqueous One Solution از طریق اندازه گیری میزان جذب در طول 490 نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گشت. تغییرات ریخت سناختی حاصل از اثر پروتئین Cry1Ia38-II16V روی سلول های Hi5 Sf21 نیز بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت گردید.

۴-۲-۷- بیان، استخراج، خالص سازی و فعال سازی پروتئین Cry1Ia7

پروتئین Cry1Ia7 از یک سویه ی اسپانیایی باکتری Bt، به نام HU4-2، که اولین بار در سال ۲۰۰۴ توسط Martínez و همکاران معرفی شده بود، گرفته شده است. در توالی اسیدهای آمینه ی دو پروتئین Cry1Ia7 و Cry1Ia38، ۹۶ درصد شباهت وجود دارد. این دو پروتئین در ۲۷ اسیدآمینه از ۷۱۹ اسیدآمینه کل پروتئین، با هم تفاوت دارند. فعالیت حشره کشی این دو پروتئین که از سویه های متفاوت ایرانی و اسپانیایی از باکتری Bt گرفته شده بودند، با هم مقایسه شدند. پروتئین Cry1Ia7 در سلول های نو ترکیب BL21 (DE3) از باکتری *E. coli* بیان شد. بیان، استخراج و خالص سازی پروتئین Cry1Ia7، مطابق پروتئین Cry1Ia38 صورت گرفت، با این تفاوت که، کشت نهایی به مدت زمان کمتری برای رسیدن به OD_{600} بین 0.5 و 0.6 دارد. بعد از حدوداً گذشت دو ساعت، به کشت نهایی IPTG اضافه گردید. هم چنین این تفاوت کم در تعداد اسیدآمینه، در پایداری پروتئین در بافر نیز تأثیرگذار بوده است. به طوری که بافر مناسب برای نگهداری پروتئین Cry1Ia7، بافر کربنات 50 میلی مولار به همراه سدیم کلراید 100 میلی مولار در $\text{pH } 11/3$ بود. در نتیجه، دیالیز پروتئین نیز در بافر متفاوتی انجام گرفت. اما سایر مراحل استخراج، خالص سازی و فعال کردن پروتئین، مشابه بخش پیشین بود.

۴-۲-۸- بررسی فعالیت حشره کشی پروتئین Cry1Ia7

دامنه ی فعالیت حشره کشی پروتئین Cry1Ia7، روی لاروهای سن یک *G. molesta*، *O. nubilalis* و *S. littoralis* و *S. exigua*، و فعالیت سلول کشی آن، روی سلول های Hi5 و Sf21 مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۲-۸-۱- زیست‌سنجی

خاصیت زهرآگینی پیش‌توکسین پروتئین Cry1Ia7 در یک غلظت 1000 ng/cm^2 روی لاروهای سن یک *G. molesta* و *S. littoralis* به روش آلوده‌سازی سطح ماده‌ی غذایی، مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حشره‌کشی توکسین فعال شده‌ی پروتئین Cry1Ia7 نیز با همان روش قبلی روی لاروهای سن یک *O. S. littoralis*، *G. molesta nubilalis* و *S. exigua* آزمون گردید. آزمایش‌های زیست‌سنجی در سه تکرار انجام و در هر تکرار از ۴۸ لارو سن یک استفاده شد. روش انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی مطابق قسمت پیشین انجام گرفت.

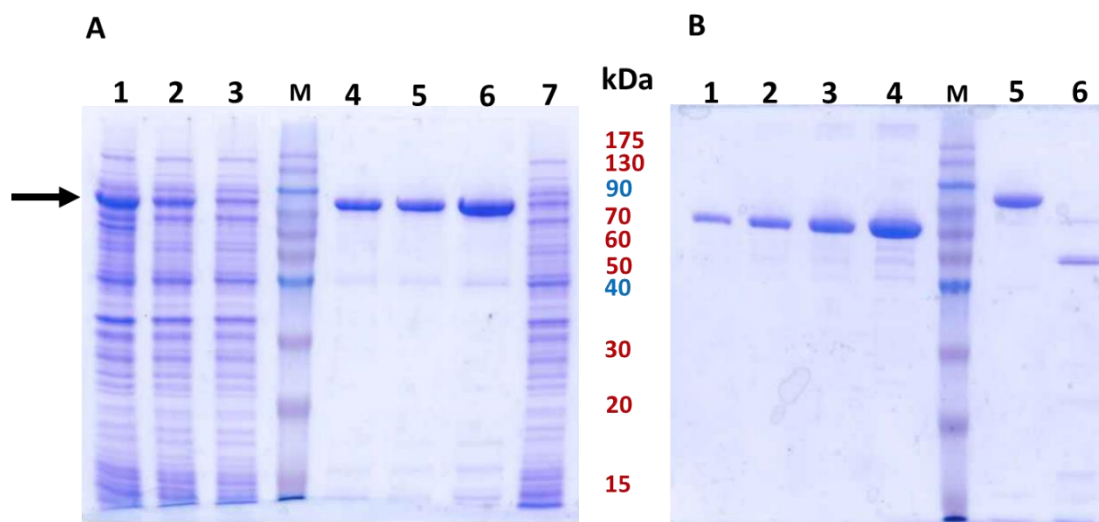
۴-۲-۸-۲- آزمون زنده‌مانی سلول

فعالیت سلول‌کشی توکسین فعال شده‌ی پروتئین Cry1Ia7، به روش درصد زنده‌مانی سلول‌ها، مطابق بخش قبلی، روی سلول‌های Sf21 و Hi5 بررسی گشت. به این ترتیب که، ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های Sf21 و Hi5 با غلظت 2×10^6 سلول/میلی‌لیتر، با ده میکرولیتر از غلظت‌های 20 ، 4 ، 8 و 16 توکسین فعال شده‌ی پروتئین Cry1Ia7، تیمار شدند. درصد سلول‌های زنده ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار شدن آن‌ها با پروتئین Cry1Ia7 تعیین گشت.

۴-۳- نتایج و بحث

۴-۳-۱- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38

پروتئین Cry1Ia38، در سلول‌های *E. coli* BL21 (DE3)، بیان گردید و پروتئینی با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون، به‌عنوان پیش‌توکسین، به دست آمد. پس از فعال کردن پیش‌توکسین ۸۰ کیلودالتونی با آنزیم تریپسین، فرم فعال شده‌ی توکسین Cry1Ia38، با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون، ایجاد شد (شکل ۴-۳). غلظت پیش‌توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38، با استفاده از چهار غلظت متفاوت از BSA، به روش چگالی‌سنجی با استفاده از نرم‌افزار Total Lab تعیین گردید.



شکل ۴-۲- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38. تصویر A؛ شماره‌های یک تا سه: بیان پروتئین در سلول‌های *E. coli*، M: مارکر پروتئینی (Pink pre-stained protein ladder, Nippon genetics)، شماره‌ی چهار: پروتئین Cry1Ia38 پس از خالص‌سازی، شماره‌های پنج و شش: پروتئین Cry1Ia38 پس از دیالیز، شماره‌ی هفت: جریان خروجی از ستون (flow through)، را نشان می‌دهد. تصویر B؛ شماره‌های یک تا چهار: چهار غلظت به ترتیب، $0/1$ ، $0/2$ و $0/4$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از پروتئین استاندارد BSA، M: مارکر پروتئینی، شماره‌ی پنج: پیش‌توکسین خالص و دیالیز شده‌ی Cry1Ia38 و شماره شش: توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38، را نشان می‌دهد. پیکان در تصویر A، به بیان پیش‌توکسین Cry1Ia38، اشاره می‌کند.

۴-۳-۲- فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia38

فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین Cry1Ia38، در یک غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم/سانتی‌متر مربع، علیه لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *S. exigua*، *G. molesta*، *S. littoralis* و *H. armigera*، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج زیست‌سنجی‌های انجام شده با پروتئین Cry1Ia38، در جدول ۴-۱، آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده، پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38، بیشترین زهرآگینی را روی لاروهای سن یک *G. molesta* داشتند. همچنین، پیش‌توکسین Cry1Ia38، باعث مرگ صد درصدی لاروهای *O. nubilalis* شده است، در حالی که توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38، باعث مرگ ۴۵ درصدی لاروهای سن یک *O.*

nubilalis شده است. به عبارتی، بین حساسیت لاروهای سن یک *O. nubilalis* به پیش توکسین و توکسین فعال شده ی Cry1Ia38، تفاوت معنی دار ($p\text{-value} = 0.0003$) وجود دارد. اما تفاوت معنی داری بین حساسیت لاروهای سایر آفات بال پولکدار به پیش توکسین و توکسین فعال شده ی Cry1Ia38، وجود نداشت. همان طور که از نتایج جدول برمی آید، لاروهای *S. exigua*، *S. littoralis* و *H. armigera* حساسیت کمتری نسبت به پروتئین Cry1Ia38، از خود نشان دادند. در نتیجه، کرم هلو و کرم ساقه خوار اروپایی ذرت، به عنوان حساس ترین میزبان های بال پولکدار برای پروتئین Cry1Ia38، شناخته شدند.

جدول ۴-۱ - میانگین (\pm خطای معیار) مرگ ناشی از فعالیت حشره کشی پیش توکسین و توکسین Cry1Ia38 در چند گونه آفت بال پولکدار.

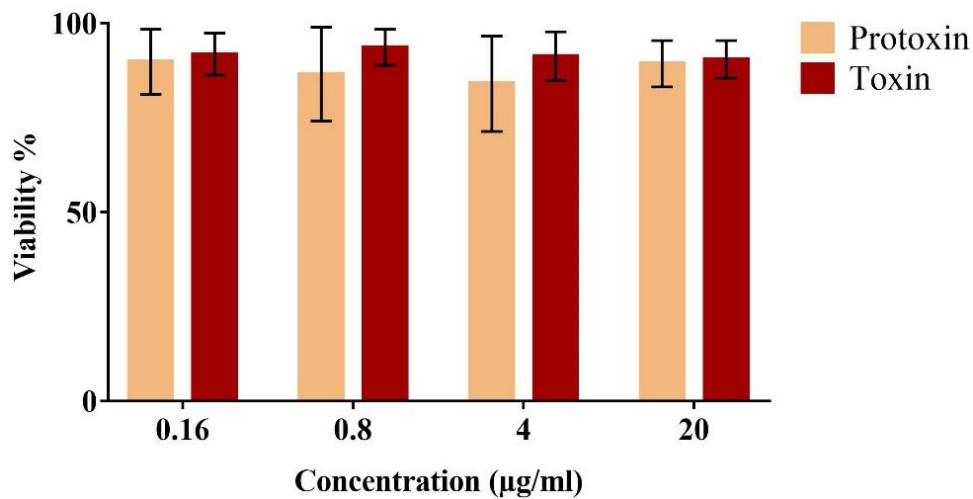
Cry1Ia38 protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm ²)	Activated toxin (1000 ng/cm ²)
<i>O. nubilalis</i>	100 \pm 0 ^{a*}	45 \pm 9 ^b
<i>S. exigua</i>	20 \pm 10 ^b	17 \pm 10 ^c
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a
<i>S. littoralis</i>	15 \pm 2 ^b	13 \pm 4 ^c
<i>H. armigera</i>	0 \pm 0 ^c	0 \pm 0 ^c

تجزیه و تحلیل آماری Two-way ANOVA، برای داده های موجود در هر ستون انجام گرفته است و زمانی که $p\text{-value} < 0.05$ بوده، میانگین های درصد مرگ به روش Tukey، گروه بندی شده است. حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده ی تفاوت آماری معنی دار ($p\text{-value} < 0.05$)، بین گونه های مختلف آفت، می باشد.

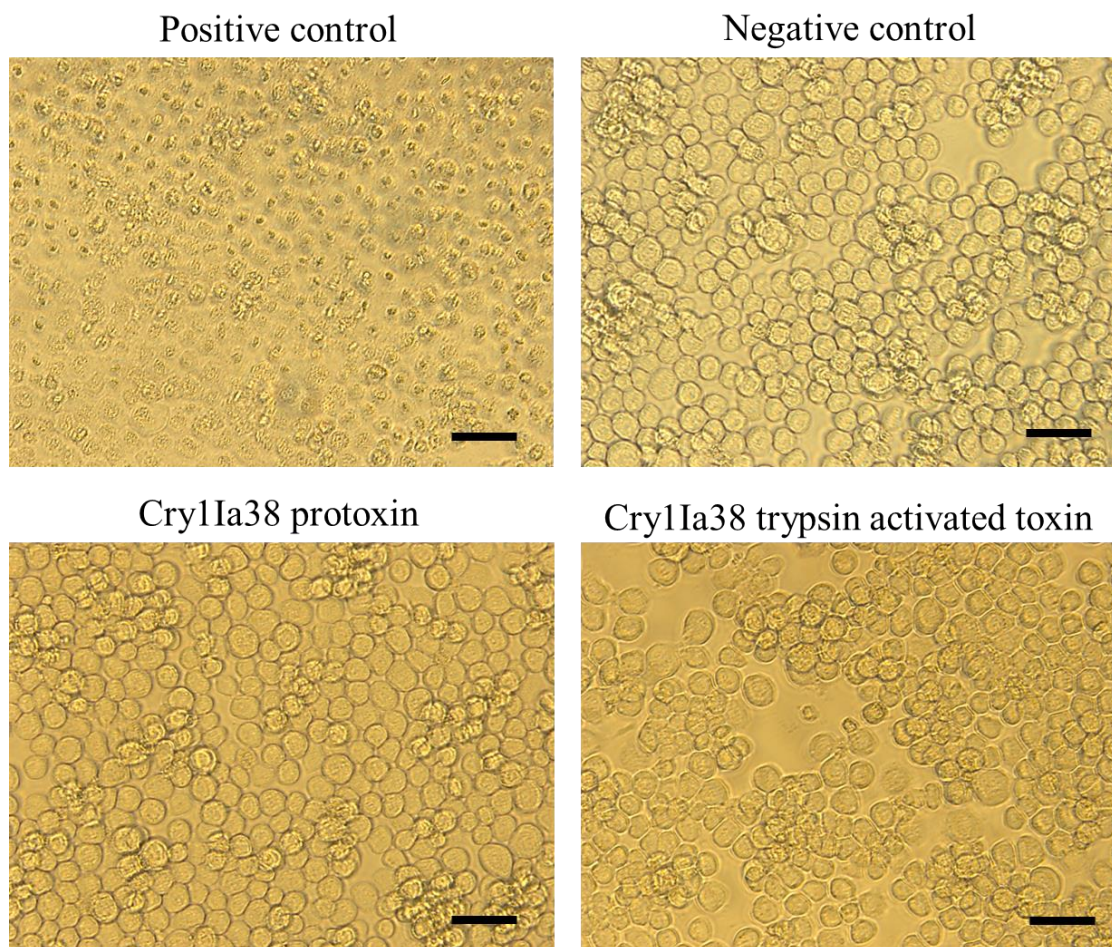
۴-۳-۳- فعالیت سلول کشی پروتئین Cry1Ia38

فعالیت سلول کشی پروتئین Cry1Ia38، به مفهوم فقدان فعالیت متابولیکی یا زنده مانگی سلول ها، روی رده ی سلولی Sf21 مورد بررسی قرار گرفت. درصد زنده مانگی سلول های Sf21، با توجه به درصد سلول های زنده در شاهد منفی و شاهد مثبت که به ترتیب، بافر کربنات ۵۰ میلی مولار (۵/۱۰ pH)، و Triton X-100 ۰/۲ درصد، دریافت کرده اند، سنجیده شد. نتایج نشان داد که، پیش توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38، خاصیت سلول کشی روی سلول های Sf21 نداشتند. هم چنین، تفاوت آماری معنی داری بین درصد سلول های زنده، پس از اینکه در معرض غلظت های متفاوتی ($p\text{-value} = 0.8745$) از پیش توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38 ($p\text{-value} = 0.5106$)، قرار گرفتند، وجود نداشت (شکل ۴-۳). پس از اینکه سلول های Sf21، به مدت ۲۴ ساعت در معرض

بالا ترین غلظت، $20 \mu\text{g/ml}$ ، مورد استفاده از پیش توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38 قرار گرفتند، ۹۰ درصد سلول‌ها، زنده و از لحاظ متابولیکی فعال بودند. هیچ تغییر ریخت‌شناسی در سلول‌های Sf21، بعد از انکوبه شدن با پروتئین Cry1Ia38، مشاهده نگردید (شکل ۴-۴).



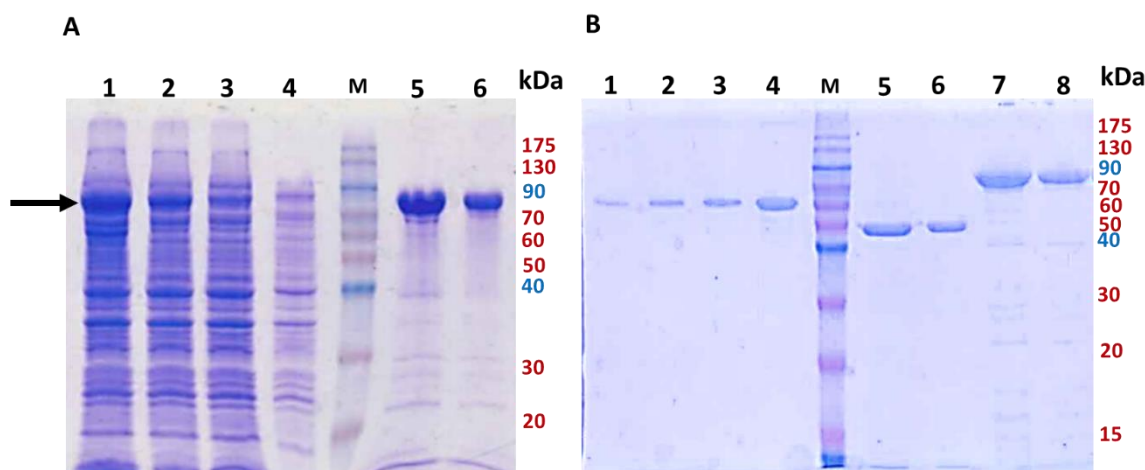
شکل ۴-۳ - میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده‌مانی سلول‌های Sf21 در مقابل پیش توکسین و توکسین فعال شده Cry1Ia38.



شکل ۴-۴- وضعیت سلول‌های Sf21 پس قرار گرفتن در معرض بالاترین غلظت (۲۰ $\mu\text{g/ml}$) پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38 قرار گرفتند (بزرگنمایی $\times 20$ و مقیاس معادل با ۵۰ میکرومتر).

۴-۳-۴- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38-I116V

پروتئین Cry1Ia38-I116V، نیز مانند پروتئین Cry1Ia38، در سلول‌های *E. coli* BL21 (DE3) بیان گردید. پروتئینی با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون، به‌عنوان پیش‌توکسین، از سلول‌های باکتری *E. coli* خالص‌سازی شد. پیش‌توکسین ۸۰ کیلودالتونی با آنزیم تریپسین به نسبت وزنی/وزنی یک:ده فعال شد، فرم فعال شده‌ی توکسین Cry1Ia38-I116V، با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون، حاصل گردید (شکل ۴-۵). غلظت پیش-توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38-I116V، با استفاده از چهار غلظت متفاوت از BSA، به روش چگالی‌سنجی با استفاده از نرم‌افزار Total Lab تعیین گردید.



شکل ۴-۵- بیان، خالص‌سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia38-I116V. تصویر A؛ شماره‌های یک تا سه: بیان پروتئین در سلول‌های *E. coli*، شماره‌ی چهار: جریان خروجی از ستون (flow through)، M: مارکر پروتئینی، شماره‌های پنج و شش: پروتئین Cry1Ia38-I116V پس از خالص‌سازی و دیالیز، و تصویر B؛ شماره‌های یک تا چهار: چهار غلظت به ترتیب، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از پروتئین استاندارد BSA، M: مارکر پروتئینی، شماره‌های پنج و شش: توکسین فعال، خالص و دیالیز شده‌ی Cry1Ia38-I116V و شماره‌های شش و هفت: پیش‌توکسین خالص و دیالیز شده Cry1Ia38-I116V، را نشان می‌دهد. پیکان در تصویر A، به بیان پیش‌توکسین Cry1Ia38-I116V، اشاره می‌کند.

۴-۳-۵- فعالیت حشره‌کشی توکسین Cry1Ia38-I116V

فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1a38-I116V، در تک غلظت ng/cm^2 ۱۰۰۰ روی لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *S. exigua*، *G. molesta* و *S. littoralis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج زیست‌سنجی حاکی از آن بود که، توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38-I116V، فعالیت حشره‌کشی روی میزبان‌های بال‌پولکدار مورد بررسی، نداشته است. در حالی که، پیش‌توکسین موتانت مورد نظر، برای لاروهای سن یک *G. molesta* و *O. nubilalis* به‌شدت زهرآگین بوده و به‌ترتیب باعث مرگ ۱۰۰ و ۹۵ درصدی لاروهای تیمار شده، گشته است. بین حساسیت لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *S. exigua*، *G. molesta* و *S. littoralis* به توکسین فعال Cry1Ia38-I116V، تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

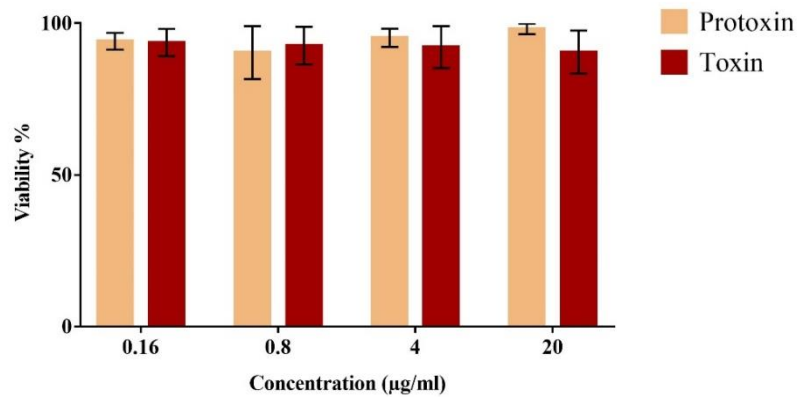
جدول ۴-۲- میانگین (\pm خطای معیار) مرگ ناشی از فعالیت حشره کشی پیش توکسین و توکسین Cry1Ia38-I116V.

Cry1Ia38-I116V protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm ²)	Activated toxin (1000 ng/cm ²)
<i>O. nubilalis</i>	95 \pm 2 ^a	11 \pm 5
<i>S. exigua</i>	12 \pm 3 ^b	0 \pm 0
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	4 \pm 2
<i>S. littoralis</i>	4 \pm 2 ^b	4 \pm 2

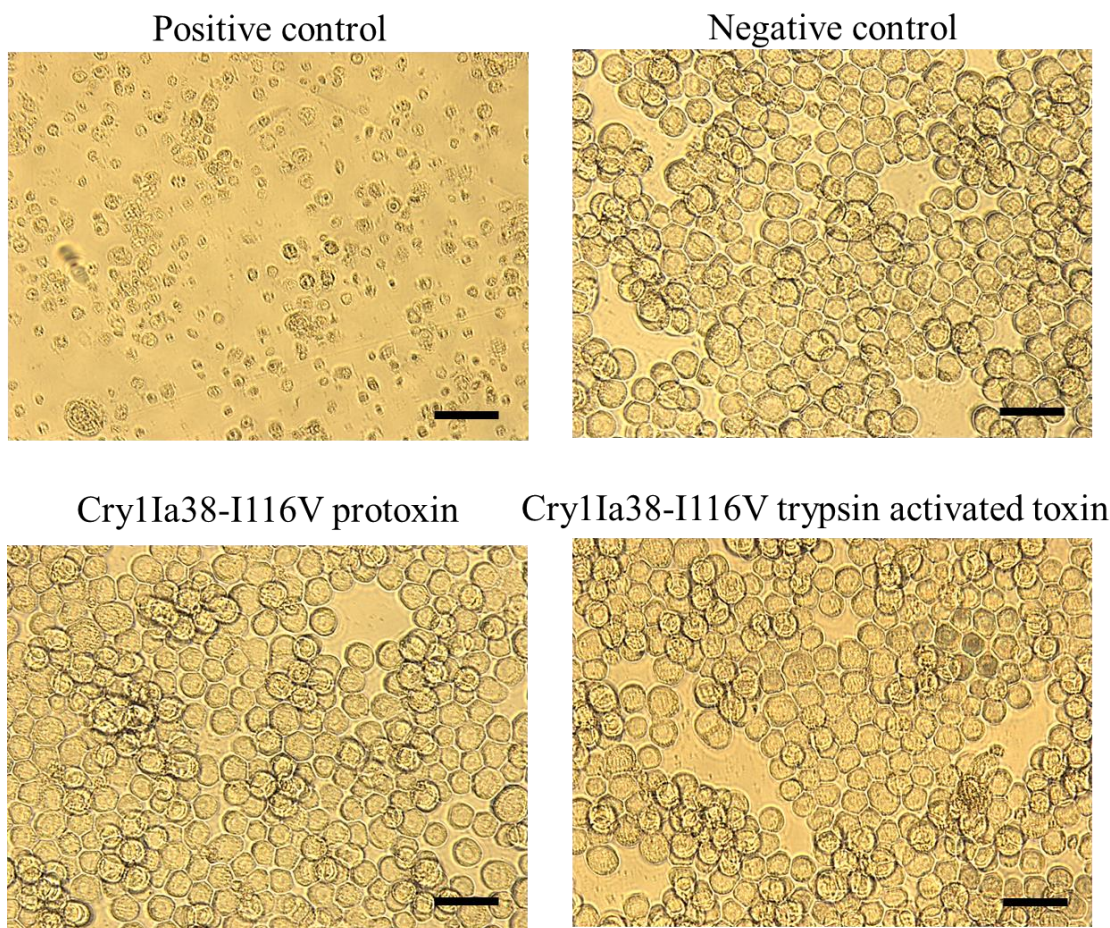
۱) تجزیه و تحلیل آماری Two-way ANOVA، برای داده‌های موجود در هر ستون انجام گرفته است و زمانی که $p\text{-value} < 0.05$ بوده، میانگین‌های درصد مرگ به روش Tukey، گروه‌بندی شده است. حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده‌ی تفاوت آماری معنی دار ($p\text{-value} < 0.05$)، بین گونه‌های مختلف آفت، می‌باشد.

۴-۳-۶- فعالیت سلول کشی پروتئین Cry1Ia38-I116V

نتایج فعالیت سلول کشی پیش توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38-I116V، روی رده‌ی سلولی Sf21 نشان داد که پیش توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38-I116V، در غلظت‌های مورد آزمون، فعالیت سلول کشی روی رده‌ی سلولی Sf21 ندارند. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد سلول‌های زنده، پس از اینکه در معرض غلظت‌های متفاوتی ($p\text{-value} = 0.2821$) از پیش توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38-I116V ($p\text{-value} = 0.2305$)، قرار گرفتند، وجود نداشت (شکل ۴-۶). پس از اینکه سلول‌های Sf21، به مدت ۲۴ ساعت در معرض بالاترین غلظت، ۲۰ $\mu\text{g/ml}$ از پیش توکسین و توکسین فعال Cry1Ia38-I116V قرار گرفتند، هیچ تغییر ریخت‌شناسی در سلول‌های Sf21، مشاهده نگردید (شکل ۴-۷).



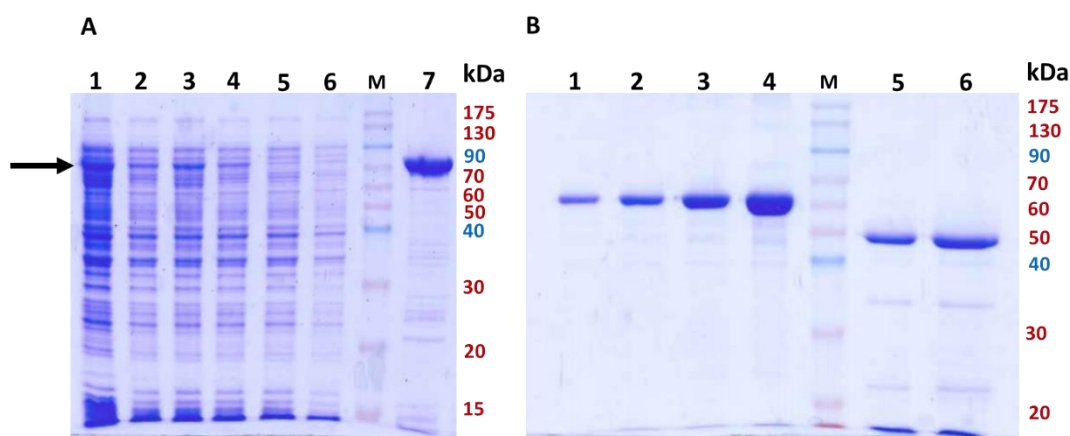
شکل ۴-۶- میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده‌مانی سلول‌های Sf21 در مقابل پیش‌توکسین و توکسین فعال شده Cry1Ia38-I116V.



شکل ۴-۷- وضعیت ظاهری سلول‌های Sf21 پس قرار گرفتن در معرض بالاترین غلظت ($20 \mu\text{g/ml}$) پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ia38-I116V (بزرگنمایی $20\times$ و مقیاس معادل با $50 \mu\text{m}$ میکرومتر).

۴-۳-۷- بیان، استخراج، خالص سازی و فعال سازی پروتئین CryIIa7

بیان ژن *cryIIa7* در سلول های *E. coli* BL21 (DE3) منجر به تولید پروتئینی با اندازه ی ۸۰ کیلودالتون گردید. پس از فعال سازی پیش توکسین ۸۰ کیلودالتونی، هسته ی مقاومی با اندازه ی ۵۰ کیلودالتون، به نام توکسین فعال، تشکیل شد (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸- بیان، خالص سازی و فعال کردن پروتئین CryIIa7. تصویر A؛ شماره های یک تا چهار: بیان پروتئین در سلول های *E. coli*، شماره های پنج و شش: جریان خروجی از ستون (flow through)، M: مارکر پروتئینی، شماره های هفت: پروتئین CryIIa7، و تصویر B؛ شماره های یک تا چهار: چهار غلظت به ترتیب، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم/میلی لیتر از پروتئین استاندارد BSA، M: مارکر پروتئینی، شماره های پنج و شش: توکسین فعال، خالص و دیالیز شده CryIIa7 را نشان می دهد. پیکان در تصویر A، به بیان پیش-توکسین CryIIa7 اشاره می کند.

۴-۳-۸- فعالیت حشره کشی توکسین CryIIa7

بر اساس نتایج به دست آمده، توکسین فعال شده ی CryIIa7، در غلظت آزمون شده، 1000 ng/cm^2 ، برای لاروهای سن یک *O. nubilalis*، *G. molesta*، *M. brassicae* و *S. littoralis*، زهرآگین نبود. به عبارتی، بین حساسیت لاروهای آزمون شده به توکسین CryIIa7، تفاوت معنی دار وجود نداشت ($p\text{-value} > 0.05$). در حالی که، پیش توکسین CryIIa7، به شدت برای لاروهای سن یک *O. nubilalis* و *G. molesta* زهرآگین بود.

تیمار لاروهای *G. molesta*، با غلظت آزمون شده از پیش توکسین Cry1Ia7، باعث مرگ ۱۰۰٪ لاروها گردید. اما، پیش توکسین Cry1Ia7، فعالیت حشره کشی در برابر لاروهای *S. littoralis*، نداشت.

جدول ۴-۳- میانگین (\pm خطای معیار) درصد مرگ ناشی از فعالیت حشره کشی پیش توکسین و توکسین Cry1Ia7 در چهار گونه آفت بال پولکدار.

Cry1Ia7 protein		
Insect species	Protoxin (1000 ng/cm ²)	Activated toxin (1000 ng/cm ²)
<i>O. nubilalis</i>	90 \pm 5 ^a	21 \pm 5
<i>G. molesta</i>	100 \pm 0 ^a	21 \pm 11
<i>M. brassicae</i>	-	9 \pm 6
<i>S. littoralis</i>	15 \pm 2 ^b	13 \pm 4

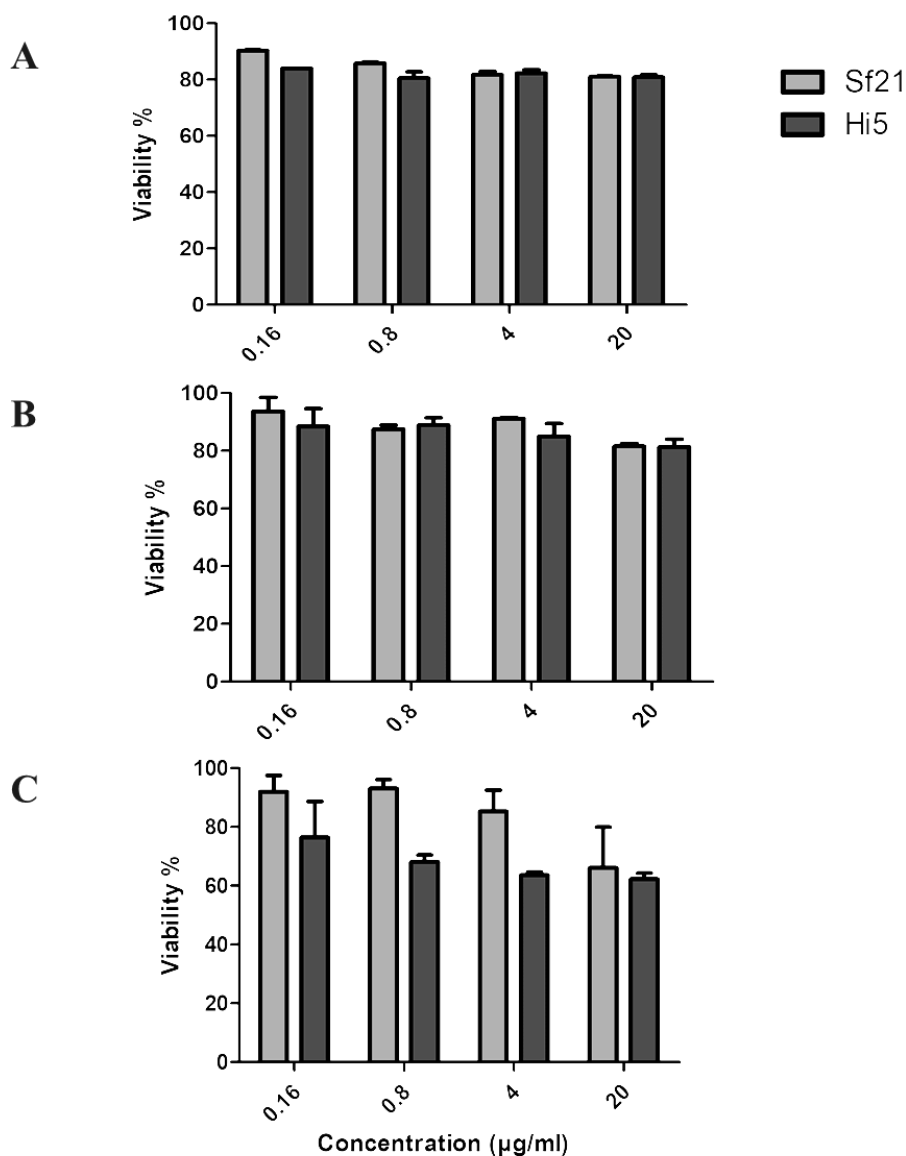
(۱) تجزیه و تحلیل آماری Two-way ANOVA، برای داده های موجود در هر ستون انجام گرفته است و زمانی که $p\text{-value} < 0.05$ بوده، میانگین های درصد مرگ به روش Tukey، گروه بندی شده است. حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار ($p\text{-value} < 0.05$)، بین گونه های مختلف آفت، می باشد. (۲) علامت (-)، نشان دهنده عدم بررسی حساسیت حشره ی آفت در برابر توکسین، می باشد.

۴-۳-۹- فعالیت سلول کشی پروتئین Cry1Ia7

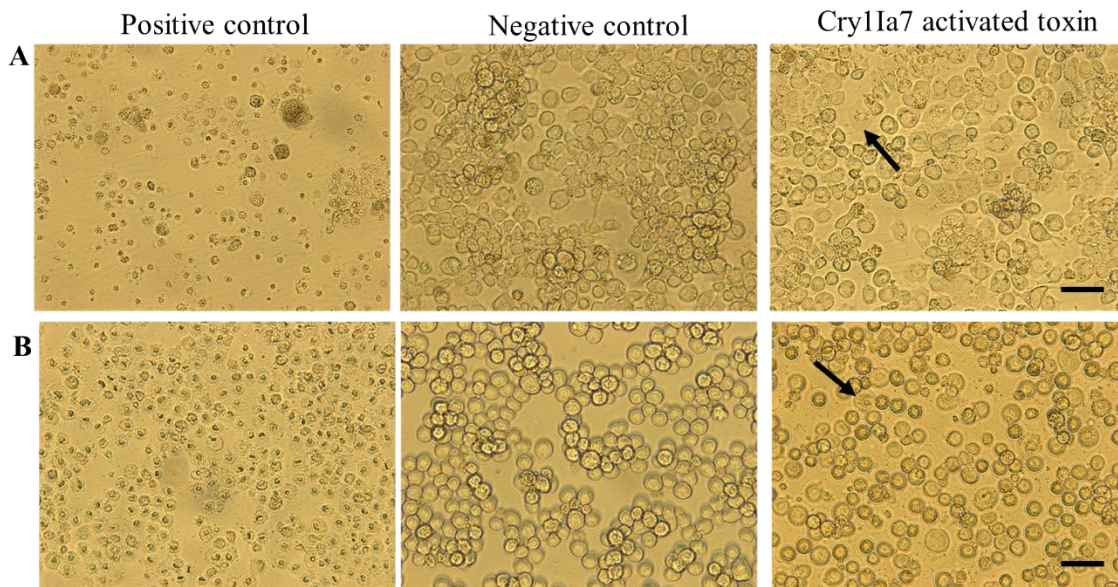
فعالیت سلول کشی توکسین Cry1Ia7، به مفهوم فقدان فعالیت متابولیسی سلول ها، روی دو رده ی سلولی از بال پولکداران، Sf21 و Hi5، آزمون گردید. نتایج نشان داد که، اختلاف معنی داری بین درصد زنده مانده سلول های Sf21 و Hi5، بعد از اینکه به مدت ۱۶ و ۲۴ ساعت در معرض توکسین Cry1Ia7، قرار گرفتند، وجود نداشت (شکل ۴-۹؛ تصاویر A و B). در حالی که، پس از ۴۸ ساعت از انکوبه کردن رده های سلولی مورد آزمون با بالاترین غلظت توکسین، ۲۰، ۴۰ درصد از سلول های Sf21 و Hi5، فعالیت متابولیسی خود را از دست دادند (شکل ۴-۹؛ تصویر C). نتایج به دست آمده حاکی از آن است که، توکسین Cry1Ia7 فعالیت حشره کشی چشم-گیری در غلظت های به کار رفته برای رده های سلولی Sf21 و Hi5، ندارد.

نتایج مطالعات میکروسکوپی روی ویژگی های ریخت شناسی سلول هایی که در معرض توکسین Cry1Ia7 بودند، نشان می دهد که، پس از گذشت ۴۸ ساعت، سلول های Sf21 و Hi5، از بالاترین غلظت مورد

استفاده از توکسین، متأثر شده‌اند. به طوری که تخریب دیواره‌ی سلولی، سلول‌های متورم و بادکنکی شکل، در آن‌ها مشهود می‌باشد (شکل ۳-۱۰).



شکل ۴-۹- میانگین (\pm خطای معیار) درصد زنده‌مانی سلول‌های Sf21 و Hi5 در مقابل توکسین فعال شده CryIIa7. درصد سلول‌های زنده، پس از اینکه، پس از اینکه به مدت ۱۶ ساعت (A)، ۲۴ ساعت (B) و ۴۸ ساعت (C)، در معرض توکسین CryIIa7، قرار گرفتند، در نمودار نشان داده شده است.



شکل ۴-۱ - وضعیت ظاهری سلول‌های Hi5 (A) و Sf21 (B)، پس از قرار گرفتن در معرض بالاترین غلظت (۲۰ µg/ml) توکسین فعال شده‌ی CryIIa7 (بزرگنمایی $\times 20$ و مقیاس معادل با ۵۰ میکرومتر). پیکان‌های سیاه‌رنگ به سلول‌های آسیب دیده اشاره می‌کنند.

همان‌طور که پیش‌تر به آن پرداخته شد، استراتژی‌های متفاوتی برای مقابله با بروز مقاومت آفات نسبت به حشره‌کش‌های بر پایه‌ی Bt، اتخاذ می‌گردد. برای به حداکثر رساندن اثر توکسین‌های Bt و برای مقابله با بروز مقاومت و یا حداقل به تأخیر انداختن مقاومت آفات، چندین توکسین از باکتری Bt که نحوه‌ی اثر متفاوتی دارند، عموماً به‌طور هم‌زمان در فرمولاسیون‌های بر پایه‌ی Bt و یا در گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما نکته‌ی مهم اینجاست که تاکنون، تعداد کمی از توکسین‌های باکتری Bt، شناسایی شده است که نحوه‌ی اثر متفاوتی داشته باشند. بنابراین، مطالعه‌ی ژن‌های جدید *cry*، برای تهیه سویه‌های باکتریایی نوترکیب و گیاهان تراریخت، از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. از آنجایی که، پروتئین‌های CryII، نحوه‌ی اثر متفاوتی نسبت به سایر پروتئین‌های Cry دارند، می‌توانند همراه با توکسین‌های دیگر، برای کاهش بروز مقاومت آفات، مورد استفاده قرار بگیرند. در نتیجه در این رساله، بر آن شدیم که پس از همسانه‌سازی ژن‌های *cryIIa38* و *CryIIa38-II16V*، سپس، بیان، استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌های *CryIIa38*، *CryIIa38-II16V* و *CryIIa7*، دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی این پروتئین‌ها، با تمرکز روی آفات بال‌پولکدار، ارزیابی گردد. با این هدف

که استفاده‌ی احتمالی این پروتئین‌ها، همراه با سایر پروتئین‌های Cry، در فرمولاسیون‌های بر پایه‌ی Bt و یا گیاهان تراریخت، توصیه گردد.

ژن *cryIIa38* که در نتیجه‌ی غربال‌گری ژن‌های سویه‌ی *B. thuringiensis* IE-1، شناخته شده بود، با موفقیت همسانه‌سازی گردید. توالی کامل این ژن با طول ۲۱۶۰ نوکلئوتید، پروتئینی با طول ۷۲۰ اسید آمینه را رمز می‌کند. توکسین جدید شناسایی شده، به کمیته‌ی نام‌گذاری توکسین‌های باکتری Bt، (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) ارسال گردید و نام "CryIIa38" به آن اختصاص داده شد.

پیش‌توکسین هر سه پروتئین مورد مطالعه؛ *CryIIa38*، *CryIIa38-II16V* و *CryIIa7*، وزن مولکولی یکسانی، حدوداً ۸۰ کیلودالتون، داشتند. وزن مولکول تخمین زده شده، وزن مولکولی رایج و معمول در بین پروتئین‌های خانواده‌ی CryII، می‌باشد (Guo et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2006; Song et al., 2003; Zhao et al., 2015; et al., 2009). هم‌چنین، توکسین فعال شده با آنزیم تریپسین نیز، در هر سه پروتئین بررسی شده، هسته‌ی مقاومی با اندازه‌ی ۵۰ کیلودالتون، تولید کرد. ساختار سه بعدی سه پروتئین مورد بررسی، با ساختار سایر توکسین‌های شناخته شده‌ی باکتری Bt، از جمله؛ *Cry1Aa*، *Cry23/37*، *Cyt2Aa* و *Vip2Aa*، مقایسه گردید (شکل ۴-۱۲). تفاوت اسیدهای آمینه در شکل ۴-۱۱، نتیجه‌ی هم‌ترازی سه توالی‌های اسید آمینه‌ای سه پروتئین *CryIIa38*، *CryIIa38-II16V* و *CryIIa7*، آمده است.

بسیاری از پروتئین‌های CryII، تا کنون شناسایی و توصیف، و فعالیت حشره‌کشی آن‌ها علیه آفات حساس احتمالی، از دو راسته‌ی بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان، ارزیابی شده است، که از آن جمله می‌توان به؛ *Earias insulana*، *Agrotis ipsilon*، *Cydia pomonella*، *Manduca sexta*، *Spodoptera* spp.، *T. ni*، *H. armigera*، *Bombyx mori*، *Telchi licus licus*، *Prays olea*، *Plutella xylostella*، *Epiphyas*، *Leguminivora glycinivorella*، *Pyrrhalta aenescens*، *H. zea*، *Ostrinia* spp.، *Tenebrio molitor* و *Anthonomus grandis*، *L. decemlineata*، *Artogeia rapae postvittana* اشاره کرد (Tailor et al., 1992; Koo et al., 1995; 1998; Choi et al., 2000; Tounsi et al., 2003;)

Song et al., 2003; Boncheva et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2006; Martins et al., 2007; Grossi-de-Sa et al., 2007; Guo et al., 2009; Dammak et al., 2010; Craveiro et al., 2010; Dammak et al., 2011; Guo et al., 2011; Bergamasco et al., 2013; Zhao et al., 2015; (Shin et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Khorramnejad et al., 2018

نتایج زیست‌سنجی سه پروتئین مورد مطالعه نشان داد که توکسین فعال شده‌ی هر سه پروتئین برای لاروهای *G. molesta* و *O. nubilalis* به شدت زهرآگین بودند. همچنین، لاروهای *O. nubilalis*، حساسیت زیادی به پیش‌توکسین پروتئین Cry1Ia38، نشان دادند. در حالی که، لاروهای سه گونه‌ی *S. exigua*، *S. S.*، *H. armigera littoralis* و *M. brassicae*، حساسیت چندانی به پروتئین‌های Cry1Ia مورد استفاده نداشتند. یافته‌های این رساله، در تأیید پژوهش‌های پیشین که به زهرآگینی توکسین‌های Cry1Ie1 و Cry1Ie2، در برابر گونه‌های *Ostrinia* و عدم بروز حساسیت لاروهای *S. exigua* و *H. armigera* به دو توکسین Cry1Ie، اشاره کرده است (Zhao et al., 2015)، می‌باشد. نکته قابل توجه آنکه، فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین‌های Cry1Ia، نسبت به توکسین فعال شده، بیشتر بوده است. فعالیت حشره‌کشی پیش‌توکسین، توکسین فعال شده (منومر) و الیگومرهای Cry1Ie، روی لاروهای *P. xylostella*، مورد بررسی قرار گرفت (Guo et al., 2009). بر اساس نتایج زیست‌سنجی، LC₅₀های به دست آمده به ترتیب برای پیش‌توکسین، منومر و الیگومر پروتئین، ۱۴، ۲۱ و ۱۴۰۰ میکروگرم به میلی‌لیتر، بودند. در نتیجه، پیش‌توکسین Cry1Ie، بیشترین زهرآگینی را بری لاروهای *P. xylostella* داشته است (Guo et al., 2009). پیش‌توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ac، نیز پتانسیل حشره‌کشی بیشتری در برابر آفات بال‌پولکدار مقاوم، نسبت به توکسین‌های فعال شده‌ی خود، دارند (Tabashnik et al., 2015). در مورد توکسین Cry1Ac، نیز گزارش شده است که بین مقدارهای LC₅₀ پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی Cry1Ac، در برابر رده‌ی سلولی CF-203، تفاوت معنی‌دار وجود ندارد (Li et al., 2018). نکته‌ی مهم در پژوهش Li و همکاران (۲۰۱۸) این است که آیا پس از تلقیح سلول‌های CF-203 با پیش‌توکسین Cry1Ac، پیش‌توکسین به توکسین فعال تبدیل شده است؟ نتایج SDS-PAGE و Western blot، حاکی از آن بوده است که، پیش‌توکسین ۱۳۰ کیلودالتونی عامل از بین رفتن سلول‌های CF-203، بوده و پیش‌توکسین تبدیل به توکسین فعال، نشده است.

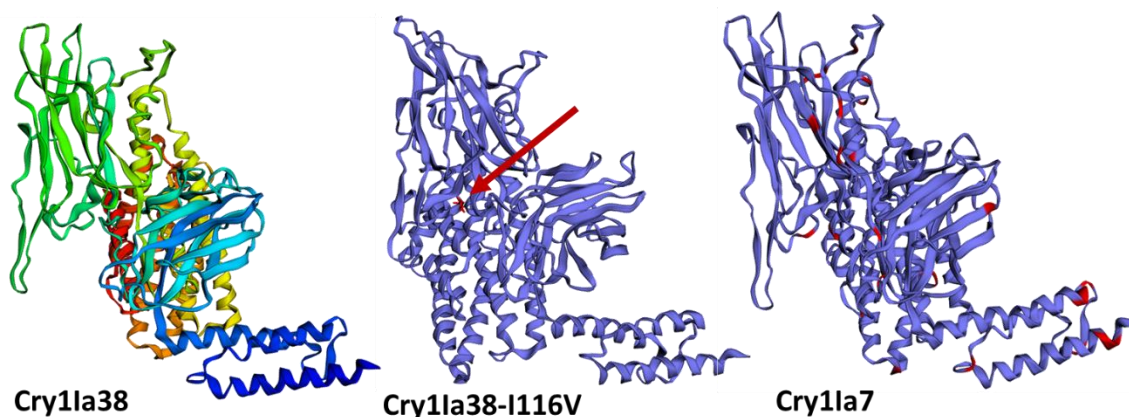
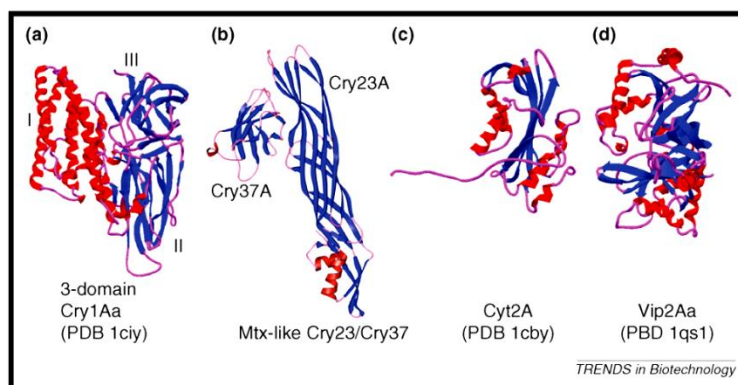
همچنین، قابل ذکر است که دو توکسین Cry1Ia38 و Cry1Ia38-I116V، با وجود تفاوت تنها در یک اسید آمینه، فعالیت حشره کشی متفاوتی داشتند. به این مفهوم که تغییر یک اسید آمینه در دومین I، پروتئین های Cry، منجر به بروز تغییر در فعالیت حشره کشی پروتئین شده است.

همان طور که اشاره شد، مطالعات زیادی روی فعالیت حشره کشی توکسین های خانواده ی CryII، صورت گرفته است، اما هیچ گزارشی مبنی بر فعالیت سلول کشی این توکسین ها وجود ندارد. در این رساله برای اولین بار، فعالیت سلول کشی سه پروتئین مذکور، مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین، نتایج مربوط به فعالیت سلول کشی پروتئین های CryIIa، با نتایج زیست سنجی سایر مطالعات، مورد مقایسه قرار گرفت. پژوهش های پیشین نشان دادند که، توکسین های CryIIa7، CryIIe1 و CryIIe2 برای لاروهای *S. frugiperda* و *T. ni*، زهر آگین نیستند (Ruiz de Escudero et al., 2006; Zhao et al., 2015)، که نتایج به دست آمده در این رساله با پژوهش های پیشین مطابقت دارد. در برخی از مطالعات به حساسیت لاروهای *S. frugiperda* به توکسین های CryIIa، CryIIa10 و CryIIa12، اشاره شده است، این نتایج بر خلاف نتایج حاصل این رساله در مورد زهر آگینی پروتئین های CryIIa روی سلول های Sf21 و Hi5 می باشد (Martins et al., 2007; Grossi-de- (Sa et al., 2007; Bergamasco et al., 2013; Oliveora et al., 2016).

در نهایت اینکه، این تنوع در فعالیت حشره کشی پروتئین های CryII، می تواند به دلیل تفاوت در آلل های باشد که روی تخصص میزبانی اثرگذار هستند و تفاوت اندکی در توالی های نوکلئوتیدی، منجر به بروز تفاوت های چشم گیر در فعالیت حشره کشی پروتئین مورد بررسی، می شود. همان طور که در این پژوهش دیده شد، دو پروتئین CryIIa38؛ تیپ وحشی و موتانت، با وجود تفاوت در یک اسید آمینه در پروتئین و یک نوکلئوتید در ژن، فعالیت حشره کشی متفاوتی نسبت به هم روی لاروهای *G. molesta* و *O. nubilalis* دارند. هم چنین از طرف دیگر، این تفاوت ها در زهر آگینی توکسین های مختلف CryII، می تواند به دلیل تفاوت در حساسیت کلنی های آفات مورد آزمون در مطالعات مختلف باشد (Hernández-Martinez et al., 2008).

Cry1Ia38	MKLKNQDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQININHEDCLKMSEYENVEPFVSASTIQTGIGIAGKILGTLGVPPFAG	80
Cry1Ia38-I116V	MKLKNQDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQININHEDCLKMSEYENVEPFVSASTIQTGIGIAGKILGTLGVPPFAG	80
Cry1Ia7	MKLKNPDKHQSFSSNAKVDKISTDSLKNETDIELQININHEDCLKI SEYENVEPFVSASTIQTGISIAGKILGTLGVPPFAG	80
Cry1Ia38	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKIISTYARNKALTDLKGLGDALAVYHDSLESWVGNRNNTTRARSVVKSS	160
Cry1Ia38-I116V	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKVSTYARNKALTDLKGLGDALAVYHDSLESWVGNRNNTTRARSVVKSS	160
Cry1Ia7	QVASLYSFILGELWPKGKNQWEIFMEHVVEEIIINQKIISTYARNKALTDLKGLGDALAVYHELESWVGNRKNTTRARSVVKSS	160
Cry1Ia38	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS	240
Cry1Ia38-I116V	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS	240
Cry1Ia7	QYIALELMFVQKLPSFAVSGEEVPLLPIYAQAANLHLLLRDASIFGKEWGLSSSEISTFYNRQVERAGDYS DHCVKWYS	240
Cry1Ia38	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRRDMTLMVLDLVALFPSYDTQMYPIKTTAQLTREVTDAIGTVHPHPSFTSTTWYNNNAP	320
Cry1Ia38-I116V	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRRDMTLMVLDLVALFPSYDTQMYPIKTTAQLTREVTDAIGTVHPHPSFTSTTWYNNNAP	320
Cry1Ia7	TGLNNLRGTNAESWVRYNQFRKDMTLMVLDLVALFPSYDTLVYPIKTTSQLTREVTDAIGTVHPNASFASTTWYNNNAP	320
Cry1Ia38	SFSAIEAAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLSRWSNTQYMNWGGHKLEFRTIGGTLNISTQGSTNTSINPVTLPFTSRDVYR	400
Cry1Ia38-I116V	SFSAIEAAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLSRWSNTQYMNWGGHKLEFRTIGGTLNISTQGSTNTSINPVTLPFTSRDVYR	400
Cry1Ia7	SFSTIESAVVRNPHLLDFLEQVTIYSLSRWSNTQYMNWGGHRLEFRTIGGMLNTSTQGSTNTSINPVTLPFTSRDVYR	400
Cry1Ia38	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQPNYESYSHRLSHIGLIS	480
Cry1Ia38-I116V	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQPNYESYSHRLSHIGLIS	480
Cry1Ia7	TESLAGLNLFLTQPVNGVPRVDFHWKFVTHPIASDNFYYPGYAGIGTQLQDSENELPPEATGQPNYESYSHRLSHIGLIS	480
Cry1Ia38	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRTNTGTFGDIRVNINPPFAQRYS	560
Cry1Ia38-I116V	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRTNTGTFGDIRVNINPPFAQRYS	560
Cry1Ia7	ASHVKALVYSWTHRSADRTNTIEPNSITQIPLVKAFNLSSGAAVVRGPGFTGGDILRRTNTGTFGDIRVNINPPFAQRYS	560
Cry1Ia38	VRIRYASTTDLQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTT PFSFLDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF	640
Cry1Ia38-I116V	VRIRYASTTDLQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTT PFSFLDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF	640
Cry1Ia7	VRIRYASTTDIQFHTSINGKAINQGNFSATMNRGEDLDYKTFRTVGFTT PFSFLDVQSTFTIGAWNFSSGNEVYIDRIEF	640
Cry1Ia38	VPVEVTYEAAYDFEKAQEKVTALFTSTNPRGLKTDVKDYHIDQVSNLVESLSDEFYLDKRELFEIVKYAKQLHIERNM	719
Cry1Ia38-I116V	VPVEVTYEAAYDFEKAQEKVTALFTSTNPRGLKTDVKDYHIDQVSNLVESLSDEFYLDKRELFEIVKYAKQLHIERNM	719
Cry1Ia7	VPVEVTYEAAYDFEKAQEKVTALFTSTNPRGLKTNVTEYHIDQVSNLVESLSNEFYLDKRELFEIVKYAKQLHTGRNM	719

شکل ۴- ۱۱- هم ترازوی توالی های اسید آمینه ای سه پروتئین Cry1Ia38، Cry1Ia38-I116V و Cry1Ia7. اسیدهای آمینه ای مشخص شده به رنگ قرمز، به وجود تفاوت در توالی اسیدهای آمینه، اشاره می کند (www.uniprot.org).



شکل ۴-۱۲- مقایسه‌ی ساختار سه بعدی توکسین‌های باکتری *Bt*. تصویر بالا، ساختار سه بعدی توکسین‌های شناخته شده‌ی باکتری *Bt*، را نشان می‌دهد (Bravo and Soberón, 2008). (a) پروتئین *Cry1Aa*، به‌عنوان مثالی از توکسین‌های سه دومینی آورده شده است. دومین I، به رنگ قرمز و دومین‌های II و III، به رنگ آبی نشان داده شده است. (b) توکسین دوتایی *Cry23/Cry37* (c) *Cyt2A*، و (d) توکسین *Vip2Aa*، می‌باشد. تصویر پایین، ساختارهای سه بعدی سه پروتئین مورد استفاده در این رساله، *Cry1Ia38*، *Cry1Ia38-I116V* و *Cry1Ia7*، را نشان می‌دهد (original). تفاوت در توالی اسیدهای آمینه با رنگ قرمز مشخص شده است. در تصویر مربوط به ساختار سه بعدی توکسین *Cry1Ia38-I116V*، پیکان قرمز رنگ به اسید آمینه‌ی شماره‌ی ۱۱۶، واقع در دومین I، اشاره می‌کند. ساختارهای سه بعدی توکسین‌های *Cry1Ia*، با استفاده از نرم‌افزار Phyre2 (Kelley et al., 2015)، مدل‌سازی گردید.



بر اساس نتایج به دست آمده در این فصل از رساله، توکسین جدید CryIIa38 برای لاروهای *G. molesta* و *O. nubilalis* زهرآگین بود. هم‌چنین وجود تفاوت‌های اندک در توالی نوکلئوتیدی پروتئین CryIIa38، منجر به بروز تفاوت‌های چشم‌گیر در فعالیت حشره‌کشی موتانت CryIIa38-II16V و پروتئین CryIIa7 گشت. اما نکته قابل توجه آنکه زهرآگینی پیش‌توکسین‌های پروتئین‌های CryIIa بیشتر از توکسین‌های فعال شده با آنزیم تریپسین، بود. پروتئین‌های CryII با وجود داشتن ویژگی‌های متمایز کننده و منحصر به فرد، در گروه پروتئین‌های CryI جای می‌گیرند. پس از بررسی فعالیت حشره‌کشی پروتئین‌های CryIIa در این رساله، دو پرسش مطرح شد که ۱. آیا نحوه‌ی اثر توکسین‌های CryIIa نیز مشابه سایر پروتئین‌های مشابه هم‌خانواده‌ی خود می‌باشد؟ به این مفهوم که آیا توکسین‌های CryIIa، نیز مانند سایر پروتئین‌های CryI (که تا به حال بررسی شده) ساختارهای الیگومری تشکیل می‌دهد؟ و این که ۲. آیا الیگومریزاسیون توکسین‌های CryIIa مرحله‌ای ضروری و اجتناب‌ناپذیر در بروز زهرآگینی این توکسین‌ها می‌باشد؟ آزمون‌های انجام گرفته در فصل بعدی برای پاسخ دادن به این پرسش‌ها، طراحی شده‌اند.

فصل پنجم

ارتباط بین الیگومریزاسیون و زهراگینی توکسین‌های
Cry1Ia

فصل پنجم: ارتباط بین الیگومریزاسیون و زهرآگینی توکسین‌های CryIIa

۵-۱- مقدمه

همان‌طور که پیش‌تر به آن اشاره شد، در مدل اتصال متوالی نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry، زمانی که پروتئین Cry1A به وسیله‌ی آنزیم‌های پروتئاز تبدیل به توکسین فعال شد، منومرهای حاصله به کادهرین، به‌عنوان اولین گیرنده، متصل می‌شوند. اتصال منومر توکسین به کادهرین باعث شکست پروتئولیتیکی جزئی دیگری در ساختار توکسین فعال می‌شود که به موجب آن الیگومرهای توکسین شکل می‌گیرند. الیگومرها میل زیادی برای اتصال برگشت ناپذیر به گیرنده‌های ثانویه دارند (Vachon et al., 2012). تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry پیش از نفوذ توکسین به غشای سلول‌های پوششی روده‌ی میانی، به‌عنوان مرحله‌ای اصلی در روند بیماری‌زایی توکسین‌های Bt، تعریف شده است (Gomez et al., 2002). اتصال متوالی توکسین Cry1A، به دو گیرنده که منجر به تشکیل الیگومر می‌شود، در مورد توکسین Cry1A، به‌طور کامل توسط پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است (Hara et al., 2003; Jiménez-Juárez et al., 2007; Arenas et al., 2010; Pardo-López et al., 2013). تشکیل ساختارهای الیگومری در چندین توکسین Cry و حتی غیر Cry، مورد مطالعه قرار گرفته است، از آن جمله می‌توان به توکسین‌های Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry1Ca، Cry1Da، Cry1Ea، Cry1Fa، Cry1Ie، Cry3Aa، Cry3Ba، Cry3Ca، Cry4Ba، Cry11Aa، Sip، Vip، Cyt1Aa، Cry64Aa1 اشاره کرد (Tingue et al., 2001; Rausell et al., 2004; Herrero et al., 2004; Pérez et al., 2007; Fabrick et al., 2009; Groulx et al., 2011; Carmona et al., 2011; López-Díaz et al., 2013; Khomkhum et al., 2015; Abe et al., 2017; Palma et al., 2017).

در میان ژن‌های cry، اعضای خانواده‌ی cryII ویژگی‌های منحصر به فردی دارند، از آن جمله؛ ۱. این ژن‌ها عموماً در سویه‌های باکتری Bt خاموش هستند، اما می‌توانند در کشت‌های باکتری *E. coli* بیان شوند. ۲. با وجود اینکه پروتئین‌های نوع CryII، از لحاظ ساختاری مشابه پروتئین‌های CryI هستند و در همین گروه هم جای می‌گیرند، اما توانایی تجمع به صورت اجسام کریستالی سلول‌های باکتری Bt را ندارند. ۳. وزن مولکولی پیش‌توکسین CryII بین ۷۰ تا ۸۱ کیلوالتون می‌باشد، در حالی که وزن مولکولی معمول در پیش‌توکسین‌های

Cry1، ۱۳۰ کیلودالتون است. ۴. پروتئین‌های CryII فعالیت دوگانه در برابر آفات بال‌پولکدار و سخت‌بالپوش دارد (Taylor et al., 1992; Choi et al., 2000). در نتیجه، با در نظر گرفتن ویژگی‌های منحصر به فرد پروتئین‌های CryII و با توجه به اینکه تا کنون مطالعاتی روی نحوه‌ی اثر این پروتئین‌ها صورت نگرفته است، تشکیل ساختارهای الیگومری، به‌عنوان یک مرحله بسیار مهم در نحوه‌ی اثر توکسین‌های Bt، روی پروتئین CryIIa7 مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، ارتباط بین تشکیل ساختارهای الیگومری و فعالیت حشره‌کشی این توکسین نیز بررسی شد.

طی مطالعات مقایسه‌ای سه توکسین Cry3A، Cry3B و Cry3C، توانایی اتصال این توکسین‌ها به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های پوششی روده‌ی میانی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، *L. decemlineata* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، هر سه پروتئین Cry3، جایگاه اتصال یکسانی دارند و برای اتصال به گیرنده، با هم رقابت می‌کنند. تشکیل ساختارهای الیگومری نیز در این پروتئین‌ها، مطالعه گردید. نتایج نشان داد که توکسین‌های Cry3، مشابه توکسین‌های Cry1A، تشکیل الیگومر، می‌دهند و هم‌بستگی مثبت و مستقیم بین تشکیل الیگومر و تشکیل منفذ توسط این پروتئین‌ها در سلول‌های پوششی روده‌ی میانی *L. decemlineata* وجود دارد (Rausell et al., 2004).

در پژوهش Likitvivatanavong و همکاران (۲۰۰۵)، با جایگزینی اسیدآمینه آلانین با برخی از اسیدآمینه‌های موجود در مارپیچ آلفای پنج دومین I پروتئین Cry4Ba، زهرآگینی و تشکیل ساختارهای الیگومری در موتانت‌های حاصل بررسی و با تیپ وحشی مقایسه گردید. همه‌ی موتانت‌ها، مشابه با تیپ وحشی، پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون، تولید کردند. فعالیت حشره‌کشی موتانت N183A، در برابر لاروهای پشه‌ی *Stegomyia aegypti*، به طور کامل از بین رفته بود، در حالی که در فعالیت حشره‌کشی چهار موتانت دیگر، کاهش کمی مشاهده گردید. نکته‌ی جالب آنکه موتانت N183K، توانایی الیگومریزه شدن خود را از دست داد. بر اساس نتایج به دست آمده، اسیدآمینه‌ی اسپارژین که در موقعیت ۱۸۳ قرار دارد، نقش اصلی در زهرآگینی و تشکیل ساختارهای الیگومری پروتئین Cry4Ba، ایفا می‌کند.

پژوهش هاي پيشين نشان داده اند كه توكنين Cyt1Aa، فعاليت حشره كشى توكنين Cry11Aa را افزايش مي دهد زيرا توكنين Cyt1Aa، به عنوان گيرنده ي متصل به غشاء براي توكنين Cry11Aa، عمل مي كند. در مورد توكنين هاي Cry، اتصال توكنين به گيرنده، تشكيل ساختارهاي اليگومري را القاء مي كند. در نتيجه در اين مورد نيز انتظار مي رود كه اتصال توكنين Cry11Aa به توكنين Cyt1Aa به عنوان گيرنده، منجر به تشكيل اليگومر هاي Cry11Aa شود. بر اساس پژوهش Pérez و همكاران (۲۰۰۷)، اتصال اتصال توكنين Cry11Aa به توكنين Cyt1Aa، منجر به تشكيل اليگومر و ايجاد منفذ در سلول هاي پوششي آفت هدف شد. هم چنين توكنين Cyt1Aa، نقش سينرژيستي داشته و باعث کاهش بروز مقاومت آفات نسبت به توكنين Cry11Aa مي شود.

ژن خاموش *cry11e* در سويه هاي Bt توسط Guo و همكاران (۲۰۰۹)، همسانه سازي و در سلول هاي *E. coli* BL21 بيان گرديد. بر اساس نتايج زيست سنجي، پروتئين ۸۴ كيلودالتوني به دست آمده براي *P. xylostella* و *O. furnacalis* زهر آگين بوده است. در پژوهش نام برده شده، پس از خالص سازي پيش توكنين، فعال سازي با استفاده از آنزيم تريپسين صورت گرفته، و منومر هاي توكنين فعال حاصل شده است. به محلول پروتئيني به دست آمده، گلو تار آلديئيد^۱، به عنوان ارتباط دهنده، اضافه گرديد و سپس توسط کروماتوگرافي اندازه-طردى^۲، جداسازي شد. بر اساس نتايج به دست آمده از کروماتوگرافي، منومر و اليگومر هاي توكنين Cry11e، شناسايي و جداسازي شد. اليگومر هاي توكنين Cry11e، به صورت دايمر و تجمعاتي بزرگ تر از تترامر، مشاهده گرديد.

مراحل مختلف نحوه ي اثر توكنين هاي Bt، شامل اتصال به گيرنده، تشكيل اليگومر و ايجاد منفذ در ۱۱ موتانت غير سمى از توكنين Cry1Ab، مورد بررسي قرار گرفت. فعاليت حشره كشى موتانت هاي به دست آمده، عليه لارو هاي *M. sexta*، بررسي گرديد. جهش هايي كه در مارپيچ آلفاي چهار دومين I توكنين Cry1Ab رخ داده بودند، فعاليت حشره كشى توكنين را به طور كامل از بين بردند. اين موتانت ها، توانايي اتصال به گيرنده،

¹ Glutaraldehyde

² Size-exclusion chromatography

تشکیل ساختارهای الیگومری و ایجاد منفذ نیز نداشتند. بر اساس نتایج به دست آمده، الیگومریزاسیون، مرحله‌ای اساسی و ضروری در زهر آگینی توکسین‌های Cry می‌باشد (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

نتیجه‌ی بررسی فعالیت حشره‌کشی موتانت‌های Cry4Ba-E159K و Cry11Aa-V142D نشان داد که فعالیت حشره‌کشی این موتانت‌ها علیه لاروهای *Aedes aegypti*، کاملاً از بین رفته است. زیرا این جهش‌ها مانع از تشکیل ساختارهای الیگومری می‌شوند (Carmona et al., 2011).

پژوهش روی پیش‌توکسین تغییر یافته‌ی Cry1Ab، نشان داد که این توکسین تغییر یافته توانایی از بین بردن جمعیت‌های مقاوم *M. sexta* به توکسین‌های Cry را دارد. همچنین، ساختارهای الیگومری در توکسین تغییر یافته، مشاهده شد (Gómez et al., 2014).

نحوه‌ی اثر توکسین Cry1Ab و موتانت‌های این پروتئین روی رده‌ی سلولی CF-1، از نقطه نظر اتصال به گیرنده، الیگومریزاسیون و تشکیل منفذ، مورد بررسی قرار گرفتند. موتانت‌های Cry1Ab، فعالیت حشره‌کشی خود را در برابر لاروهای *M. sexta* و سلول‌های CF-1، از دست دادند. اما جهشی که در ماریپیج آلفای یک دومین I توکسین Cry1Ab، منجر به افزایش زهر آگینی این توکسین روی سلول‌های CF-1 گردید. این موتانت، بدون نیاز به گیرنده، توانایی تشکیل ساختارهای الیگومری را داشت (Portugal et al., 2014).

برهم‌کنش توکسین Cry1Ac و توکسین تغییر یافته‌ی Cry1Ac (Cry1AcMod)، در برابر سلول‌های پوششی روده‌ی میانی حشرات حساس و مقاوم *Pectinophora gossypiella*، ارزیابی گردید. توکسین Cry1AcMod نسبت به Cry1Ac، در انتهای آمینی دومین I (ماریپیج آلفای یک) ۵۶ اسید آمینه کمتر دارد. بر اساس نتایج به دست آمده، Cry1AcMod بدون نیاز به گیرنده‌ی کادهرین توانایی تشکیل ساختارهای الیگومری را دارد. همچنین، زهر آگینی Cry1AcMod برای لاروهای *P. gossypiella* مقاوم به توکسین Cry1Ac، ۱۰۰۰ برابر بیشتر از توکسین Cry1Ac، می‌باشد. در نتیجه، بروز مقاومت در کرم سرخ پنبه به توکسین Cry1Ac، به دلیل کاهش توانایی پروتئین برای اتصال به گیرنده و کاهش تشکیل ساختارهای الیگومری، بوده است. نتایج این پژوهش، نقش کادهرین را در الیگومریزاسیون توکسین‌های Cry، تأیید می‌کند. در نتیجه در جمعیت‌های مقاوم

کرم سرخ پنبه که در کادهرین آنها جهش رخ داده است، توکسین Cry1AcMod بدون نیاز به کادهرین، الیگومریزه می گردد و لارو میزبان را از بین می برد (Ocelotl et al., 2015).

پروتئین Cry46Aa1، که به آن پاراسپورین-۲ (PS2)، هم گفته می شود، بعد از اتصال به گیرنده های پروتئینی متصل شونده به گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول، توانایی تشکیل ساختارهای الیگومری را دارد. لازم به ذکر است که پروتئین Cry46Aa1، فعالیت سلول کشی برای سلول های سرطانی انسانی دارد (Abe et al., 2017).

توکسین Cry2Ab، یک توکسین تشکیل دهنده ی منفذ از توکسین های Bt می باشد که علیه آفات بال پولکدار مورد استفاده قرار می گیرد. پژوهش Xu و همکاران (۲۰۱۸)، نشان داد که فعال شدن پیش توکسین Cry2Aa، با عصاره ی روده ی میانی لاروهای *P. xylostella*، برای فعالیت حشره کشی این توکسین ضروری می باشد. موتانت هایی از توکسین Cry2Aa، که در زنجیره های آلفای چهار و پنج دچار جهش شده اند، تشکیل الیگومر نمی دهند و زهرآگینی آنها به شدت تحت تأثیر همین مسئله برای لاروهای *P. xylostella* کاهش یافته است. یافته های این پژوهشگران به اهمیت تشکیل ساختارهای الیگومری در زهرآگینی توکسین Cry2Aa، اشاره می کند.

بنابراین، تشکیل ساختارهای الیگومری در توکسین Cry1Ia و وجود ارتباط مستقیم بین تشکیل این ساختارها و بیماری زایی توکسین Cry1Ia، به عنوان فرضیه این فصل از رساله در نظر گرفته شد.

۵-۲- مواد و روش ها

۵-۲-۱- آماده سازی پروتئین های Cry1Ia7 و Cry1Ab

در این پژوهش، از یک پروتئین مرجع، Cry1Ab، به عنوان شاهد برای بررسی و مقایسه ی نحوه ی اثر پروتئین Cry1Ia7 استفاده گردید. تشکیل و اهمیت ساختارهای الیگومری پروتئین Cry1Ab در زهرآگینی آن، بیشتر به طور کامل در منابع مختلف مورد بررسی قرار گرفته بود. در نتیجه، در این مطالعه از پروتئین Cry1Ab

که از لحاظ ساختاری با پروتئین CryIIa7 در یک گروه قرار می‌گیرند، به‌عنوان مدل و مرجع برای تأیید صحت تشکیل ساختارهای الیکومری در پروتئین CryIIa7 استفاده گردید.

پروتئین CryIAb مورد استفاده در این پژوهش از سویه‌ی نوترکیب *E. coli* GG094-208 اهدا شده از طرف Dr. R.A. de Maagd (Wageningen University, Wageningen, Netherlands) گرفته شد. بیان پروتئین، استخراج اجسام کریستالی، خالص‌سازی پروتئین، انحلال و فعال‌سازی پیش‌توکسین بر اساس روش Sayyed و همکاران (۲۰۰۵)، انجام گرفت. روش انجام کار به این ترتیب بود که، باکتری *E. coli* در محیط کشت TB ($17 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ میلی‌مولار، $72 \text{ K}_2\text{HPO}_4$ میلی‌مولار، $10/8$ گرم تریپتون، $21/6$ گرم عصاره‌ی مخمر و $0/36\%$ گلیسرول در یک لیتر آب) حاوی 25 میکروگرم آمپی‌سیلین در هر میلی‌لیتر از محیط کشت، در دمای 37 درجه سلسیوس، کشت داده شد. هر گرم از سلول‌های باکتری حاوی پروتئین بیان شده‌ی CryIAb، در سه میلی‌لیتر از بافر لیز^۱ ($50 \text{ mM Tris-HCl pH } 8.0, 5 \text{ mM EDTA}, 100 \text{ mM NaCl}$) و 800 میکروگرم از آنزیم لیزوزیم، مخلوط گردید. دی.ان.ای موجود در مخلوط پروتئینی با افزودن 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنزیم DNase، هضم شد. مخلوط تهیه شده به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نگه داشته شد. بعد از سانتریفیوژ با دور $40000 \times g$ به مدت 20 دقیقه، ته‌نشین که حاوی پیش‌توکسین‌های CryIAb بود، چند مرتبه با بافر شست‌وشو ($20 \text{ mM Tris-HCl pH } 7.5, 1\% \text{ Triton X-100}, 1\text{M NaCl}$)، شسته شد. برای انحلال پیش‌توکسین‌های CryIAb از بافر انحلال ($50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3 \text{ pH } 10.0, 100 \text{ mM NaCl}, 10 \text{ mM}$) (dithiothreitol)، به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس استفاده گردید. پیش‌توکسین‌های محلول با سانتریفیوژ با دور $158000 \times g$ به مدت 15 دقیقه، از مواد غیر محلول جداسازی شدند. فعال کردن پیش‌توکسین CryIAb، با استفاده از آنزیم تریپسین با نسبت وزنی/وزنی ده میلی‌گرم از پروتئین CryIAb به یک میلی‌گرم از آنزیم تریپسین، در دمای 37 درجه سلسیوس، به مدت دو ساعت انجام گرفت. خالص‌سازی توکسین فعال شده‌ی CryIAb، از روش کروماتوگرافی تبادل یونی^۲ با استفاده از ستون MonoQ 5/5 و در دستگاه کراماتوگرافی ÄKTA 100 explorer system (GE Healthcare, United Kingdom) انجام گرفت. بدین منظور، ابتدا

¹ Lysis buffer

² Anion-exchange chromatography

بافر توکسین فعال شده ی Cry1Ab، با دیالیز پروتئین، با بافر ۲۰ میلی مولار Tris-HCl با pH ۹، تعویض شد. پروتئین دیالیز شده به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور $16000 \times g$ سانتریفیوژ گردید و روئشین از فیلتر ۰/۲ میکرومتری با غشای ناپلونی، عبور داده شد. پروتئین فیلتر شده، در ستون HiTrap Q HP (GE Healthcare) با حجم پنج میلی لیتر، بارگذاری شد. پروتئین Cry1Ab در شیب ۲۰ تا ۷۰ درصد بافر ۲۰ میلی مولار Tris-HCl، یک مولار سدیم کلراید با اسیدیته ی ۹، از ستون جدا و شسته می شود. در نتیجه، در این بازه، قسمت های ۱ یک میلی لیتری از خروجی ستون برداشته و سپس روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE، به صورت جداگانه آنالیز شد.

همان طور که پیشتر شرح داده شده است، پروتئین Cry1Ia7 نیز از یک سویه ی اسپانیایی باکتری Bt، به نام HU4-2، گرفته شده بود. بیان، استخراج، خالص سازی و فعال کردن پروتئین Cry1Ia7 در بند ۲۲-۳ توضیح داده شده است.

۵-۲-۲- حشرات مورد استفاده

تشکیل ساختارهای الیگومری روی مدل های متفاوت مشتق شده از سلول؛ رده ی سلولی حشرات و BBMV^۲، مطالعه گردید. در انتخاب میزبان، برای این قسمت از رساله، به چند مورد توجه شد؛ ۱. به دلیل فعالیت دوگانه حشره کشی توکسین های CryII روی آفات بال پولکدار و سخت بالپوش، از هر دو راسته، میزبان هایی انتخاب گردید. ۲. حساسیت میزبان های انتخابی به دو توکسین Cry1Ab و Cry1Ia7 مورد توجه قرار گرفت. به این ترتیب که برای هر دو توکسین، میزبان های حساس و متحمل انتخاب گردید. در نتیجه، این قسمت از آزمایش ها روی لاروهای *O. nubilalis* و *L. botrana* از بال پولکداران، *L. decemlineata* از سخت بالپوشان، و رده ی سلولی Sf21، انجام پذیرفت.

¹ Fraction

² Brush Border Membrane Vesicle (BBMV)

۵-۲-۳- جداسازی روده‌ی میانی و تهیه BBMV

لاروهای سن پنجم *O. nubilalis* و لاروهای سن چهارم *L. decemlineata* کالبدشکافی شدند و روده‌ی میانی آن‌ها خارج گردید. روده‌های تشریح شده در بافر سرد MET (مانیتول^۱ ۰/۳ مولار، EGTA پنج میلی‌مولار، ۱۷ Tris-HCl میلی‌مولار در pH ۷/۵) شست‌وشو داده، در نیتروژن مایع حفظ و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مورد لاروهای سن آخر *L. botrana*، چون بسیار کوچک هستند، روده‌ی میانی تشریح نشد و BBMV از کل بدن لارو استحصال گردید. تهیه‌ی BBMV به روش رسوب افتراقی منیزیم^۲ (Wolfersberger et al., 1987)، که توسط Escriche و همکاران (۱۹۹۵)، تغییر داده شده است، انجام گرفت. بدین ترتیب که، روده‌های میانی تشریح شده و یخ زده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس، وزن و به یک بشر تمیز منتقل شدند. در مورد، *L. botrana*، وزن کل لارو در نظر گرفته شد. روده‌های میانی استخراج شده با بافر سرد شده‌ی MET به حجم نه برابر وزن روده‌ها، مخلوط شدند. سپس، با هم‌زن برقی، روده‌ها با بافر MET، طی دو چرخه‌ی یک دقیقه‌ای با حداقل سرعت، ۵۰۰۰ دور در دقیقه، به خوبی مخلوط شدند. تمامی مراحل تهیه BBMV روی یخ انجام گرفت. در ادامه، مخلوط به دست آمده از گازهای استریلی که بر بالای یک استوانه مدرجی که پیشتر روی یخ گذاشته شده بود، عبور داده شد. حجم مخلوط هم‌گن عبور کرده از فیلتر در استوانه مدرج اندازه‌گیری شد و هم‌حجم آن ۲۴ MgCl₂ میلی‌مولار، اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگه داشته شد. سپس، اجزای بزرگی از روده که به خوبی هم‌وزن نشده‌اند، با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس و با دور ۲۵۰۰ × g، جدا گشت. رونشین به دست آمده، مجدد به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس و با دور ۳۱۰۰۰ × g، سانتریفیوژ گردید. رونشین دور ریخته شد و ته‌نشین به محفظه‌ی شیشه‌ای هم‌وزن‌نایزر برقی منتقل گشت. ته‌نشین با بافر MET با حجمی معادل نصف حجم مصرف شده‌ی اولیه، مخلوط شد. در مرحله‌ی بعد، نصف حجم بافر MET، ۲۴ MgCl₂ میلی‌مولار به مخلوط هم‌گن شده اضافه گردید. مخلوط به دست آمده، به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگه داشته شد. بخش‌های جانبی و تحتانی سلول‌های پوششی روده‌ی میانی، با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس و با دور ۲۵۰۰ × g، جدا گشت. سپس، رونشین به

^۱ Mannitol

^۲ Differential magnesium precipitation

تيوب تميز و جديدي منتقل و مجدد به مدت ۳۰ دقيقه، در دماي چهار درجه سلسيوس و با دور $31000 \times g$ ، سانترفيوژ گرديد. ته نشين نهايي به دست آمده، بسته به اندازه ي ته نشين، در يك يا دو ميلي ليتر از بافر MET ۱۲ ميلي مولار مخلوط گشت. سهم هاي ۵۰ و ۱۰۰ ميكروليتری از BBMV خالص شده، پس از تعيين غلظت به روش Bradford، تهيه، در نيتروژن مايع حفظ و در فریزر ۸۰- درجه سلسيوس نگهداری شد.

۵-۲-۴- نشان دار کردن با بيوتين^۱

بعد از اينكه پروتئين هاي Cry1Ab و Cry1Ia7 در معرض ساختارهاي مشتق شده از سلول هاي حشرات قرار گرفتند، ساختار پروتئين ها از لحاظ اندازه، در وسترن بلات، بررسی شد. در نتيجه برای رديابي پروتئين هاي مورد نظر، نیاز به آنتی بادی اختصاصی آن پروتئين ها بود. در مورد پروتئين Cry1Ab، آنتی بادی اختصاصی چندهمسانه ای^۲ در آزمایشگاه کنترل بيوتکنولوژی آفات دانشگاه والنسيا، موجود بود. اما برای رديابي پروتئين Cry1Ia7، به دليل عدم دست داشتن آنتی بادی اختصاصی، نیاز بود كه پروتئين با بيوتين نشان دار شود.

بيوتين يا ويتامين B7، در واقع يك کوآنزيم برای آنزيم هاي كربوكسيلاز است كه در تشكيل اسيدهاي چرب، كربوهيدرات ها و اسيدهاي آمينه نقش دارد. در بيوشيمي، بيوتينيلاسيون^۳ به فرآيندی گفته می شود كه بيوتين را به يك پروتئين، اسيد نوكلئيك و يا ساير مولكول ها متصل می كند. بيوتينيلاسيون يك فرآيند بسيار دقيق، تخصصی و سريع است و به دليل اندازه كوچك بيوتين (وزن مولكولی برابر با ۲۴۴/۳۱ گرم/مول)، فعاليت طبيعي مولكول هايی كه به آن متصل می شود را مختل نمی كند. بيوتين به استرپتاويدين^۴ و آويدين^۵ با تمايل بسيار بالا، سرعت و درجه تخصصی زياد متصل می شود. روش كار به اين ترتيب بود كه، تعداد زيادی از مولكول هاي بيوتين به پروتئين Cry1Ia7 متصل شدند، كه خود باعث اتصال تعداد زيادی از مولكول هاي پروتئينی استرپتاويدين و آويدين شد كه در نهايت منجر به افزايش حساسيت در شناسایی پروتئين مورد نظر گرديد.

¹ Biotin labelling

² Polyclonal

³ Biotinylation

⁴ Streptavidin

⁵ Avidin

توکسین فعال شده‌ی پروتئین CryIIa7، با استفاده از کیت 'Protein biotinylation'، بر اساس دستور شرکت سازنده، با بیوتین نشان‌دار شد. قبل از نشان‌دار کردن پروتئین، توکسین فعال شده‌ی CryIIa7 در بافر کربنات سدیم ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) ۴۰ میلی‌مولار، pH ۸/۶، به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس، دیالیز شد. پروتئین دیالیز شده، در دور $16000 \times g$ ، دمای چهار درجه سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از تعیین غلظت رونشین، هر ۱۰۰۰ میکروگرم از پروتئین CryIIa7 با ۴۰ میکرولیتر از معرف برچسب زدن با بیوتین، مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر با دور ۶۰ دور در دقیقه نگه داشته شد. سپس، پروتئین نشان‌دار شده، از ستون PD-10 desalting column (GE Healthcare) که پیشتر با بافر نمکی فسفات 1X متعادل شده بود، عبور داده شد. پروتئین نشان‌دار شده و عبور کرده از ستون، با استفاده از دستگاه نانودراپ، تعیین غلظت شد و روی ژل SDS-PAGE آنالیز گردید. صحت و درستی نشان‌دار کردن پروتئین CryIIa7 با بیوتین با آزمون وسترن بلات^۱، تأیید گردید. در نهایت، به دلیل ناپداری پروتئین CryIIa7، در اسیدپه‌های پایین‌تر از ۱۱، پروتئین مجدد دیالیز و در کربنات سدیم ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) ۵۰ میلی‌مولار، pH ۱۱/۳، نگهداری شد. با استفاده از فیلترهای سانتریفیوژی^۳ Amicon Ultra-4 10K (Millipore)، پروتئین نشان‌دار و دیالیز شده، تغلیظ شد.

۵-۲-۵- بررسی ساختارهای الیگومری

در طراحی این آزمایش انتظار می‌رفت که، مونومرهای ۶۵ و ۵۰ کیلودالتونی توکسین‌های فعال به ترتیب CryIIa7 و CryIAb، بعد از اینکه در معرض سلول‌های حشرات یا BBMV قرار می‌گیرند، به دلیل اتصال به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های حشرات، برش پروتئازی در انتهای آمینی توکسین رخ دهد که منجر به حذف زنجیره آلفای یک دومین I شود. در نتیجه این برش، تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین القا می‌شود. سپس، الیگومرهای (تترامر) ۲۰۰ تا ۲۵۰ کیلودالتونی در وسترن بلات، تشخیص داده شوند.

¹ GE Healthcare

² Western Blot

³ Centrifugal filter device

۵-۲-۱- بررسی ساختارهای الیگومری با استفاده از ردهی سلولی

برای انجام آزمون‌های الیگومریزاسیون^۱، تک لایه‌ی رشد کرده از سلول‌های Sf21، در محیط کشت سلولی تازه Grace بدون FBS، تعلیق شد. غلظت 2×10^6 سلول/میلی‌لیتر، تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده شده به چاهک‌های یک پلیت ۹۶-خانه‌ای اضافه گردید. سلول‌ها به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. سپس، ۲۰ میکرولیتر از توکسین فعال شده و نشان‌دار شده‌ی Cry1Ia7 و یا توکسین فعال شده‌ی Cry1Ab، با غلظت $0.2 \mu\text{g/ml}$ به هر چاهک اضافه شد. غلظت نهایی توکسین در هر چاهک برابر با $0.3 \mu\text{g/ml}$ بود. پلیت‌های حاوی سلول‌های Sf21 و توکسین، به مدت سه ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. چاهک‌های شاهد، با ۲۰ میکرولیتر بافر کربنات 50 mM pH ۱۰/۵، تیمار شدند. پس از سپری شدن سه ساعت، سلول‌های تیمار شده با توکسین به میکروتیوب‌های $1/5$ میلی‌لیتری تمیزی منتقل شدند. با سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور $16200 \times g$ ، سلول‌های Sf21 رسوب داده شدند. روشن‌بین به دست آمده که حاوی پروتئین‌های متصل نشده به غشای سلولی بود، به منظور مقایسه به ته‌نشیت، نگهداری و در ژل بارگذاری گردید. پروتئین‌های متصل شده به غشای سلول‌های Sf21، با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر کربنات 50 mM pH ۱۰/۵ مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور $18800 \times g$ سانتریفیوژ شدند. روشن‌بین دور ریخته شد و به‌نشین ده میکرولیتر بافر کربنات 50 mM pH ۱۰/۵ اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس حرارت دیدند و سپس در ژل SDS-PAGE ده درصد بارگذاری شدند. به منظور ردیابی اختصاصی باندهای مربوط به پروتئین‌های مورد نظر، وسترن بلات انجام شد. به این ترتیب که، پس از تفکیک پروتئین‌ها با الکتروفورز SDS-PAGE، باندهای ژل به دست آمده به یک قطعه غشای polyvinylidene difluoride (PVDF) منتقل گردید. غشای PVDF به مدت ۱۰ ثانیه در متانول و یک دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور نگه داشته شد. سپس، به مدت حداقل ۵ دقیقه، غشای تهیه شده به همراه کاغذهای صافی سه میلی‌متری و اسفنج‌های دستگاه وسترن بلات، در بافر انتقال^۲ (گالیسین ۳۹ میلی‌مولار، SDS 0.37% درصد، Tris-HCl 48 mM میلی‌مولار، متانول ۲۰ درصد) خیسانده شد. پس از پایان

^۱ Oligomerization^۲ Blotting buffer

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید، بخش متراکم کننده ژل جدا گردید و مابقی ژل حاوی پروتئین های تفکیک شده بود، نیز به مدت پنج دقیقه در بافر مذکور نگه داشته شد. سپس، از قسمت الکتروود منفی به سمت الکتروود مثبت دستگاه ساندویچ وسترن بلات به این ترتیب چیده شد؛ اسفنچ، سه لایه کاغذ صافی، ژل، غشای PVDF، سه لایه کاغذ صافی و اسفنچ. بعد از تهیه ی ساندویچ، به کمک یک غلتک^۱ دستی پلاستیکی، حباب های هوای ایجاد شده، خارج گردید. ساندویچ تهیه شده در کاست^۲ دستگاه جای گرفت و کاست به تانک انتقال^۳ که پیشتر با بافر انتقال پر شده بوده، منتقل شد. در تانک دو واحد خنک کننده^۴ و یک آهنربای دو سانتی متری قرار داده شد. انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشای PVDF، به مدت یک ساعت، با ولتاژ ثابت، ۱۰۰ ولت و جریان ۳۵۰ میلی آمپر، انجام شد. در حین انتقال، دستگاه وسترن در اتاق با دمای چهار درجه سلسیوس نگه داشته شد و روی یک همزن مغناطیسی قرار داشت و بافر انتقال به دلیل وجود آهنربا، به طور دائم هم زده می شد. پس از پایان انتقال، غشای PVDF، خیلی سریع با آب مقطر شست و شو داده می شد و سپس در بافر بلوکه کننده^۵، (PBST؛ تیوین-۲۰، ۰/۱ درصد در بافر نمکی فسفات) حاوی پنج درصد شیر خشک، به مدت یک شب، در دمای چهار درجه سلسیوس، روی شیکر با دور آرام نگه داشته شد. سپس، غشای PVDF سه مرتبه هر کدام به مدت پنج دقیقه، با بافر PBST، روی شیکر با ۶۰ دور در دقیقه شسته شد. پروتئین های Cry1Ab، با آنتی بادی اختصاصی چندهم سانهای اولیه ی anti-Bt Cry1Ab/1Ac، از شرکت Abraxis و آنتی بادی ثانویه ی horseradish peroxidase (HRP) شناسایی گردید. به این ترتیب که، غشای PVDF با آنتی بادی اولیه ی رقیق شده در بافر PBST، به نسبت ۱:۱۰۰۰۰ به مدت یک ساعت، روی شیکر نگه داشته شد. سپس، غشای PVDF سه مرتبه هر کدام به مدت پنج دقیقه، با بافر PBST، روی شیکر با ۶۰ دور در دقیقه شسته شد. در ادامه، غشای PVDF با آنتی بادی ثانویه (anti-rabbit) رقیق شده در بافر PBST، به نسبت ۱:۳۰۰۰۰ به مدت یک ساعت، روی شیکر نگه داشته شد. در حالی که، پروتئین های نشان دار شده ی CryIIa7، با آنتی بادی streptavidin-conjugated horseradish peroxidase، رقیق شده با PBST به نسبت ۱:۲۰۰۰، شناسایی گردید. سپس، در آخرین مرحله ی شست و شو،

¹ Roler

² Cassette

³ Transfer tank

⁴ Cooling unit

⁵ Blocking buffer

غشای PVDF سه مرتبه هر کدام به مدت پنج دقیقه، با بافر PBST، روی شیکر با ۶۰ دور در دقیقه شسته شد. هر دو پروتئین Cry1Ab و Cry1Ia7، با روش chemiluminescence، با استفاده از کیت ECLTM prime (GE Healthcare) western blotting detection reagent، و در دستگاه ImageQuant LAS400 precision plus protein dual (GE Healthcare) در تمامی ژل های مربوط به وسترن بلات از نشانگر پروتئینی colour standards (bio-Rad, Carlsbad, CA) استفاده گردید. هر یک از آزمون های الیگومریزاسیون، حداقل سه مرتبه تکرار گشت.

۵-۲-۵-۲- بررسی ساختارهای الیگومری با استفاده از BBMV

قبل از شروع آزمایش سهم های ۱۰۰ میکرولیتری تهیه شده از BBMV به مدت ده دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور $16000 \times g$ سانتریفیوژ شدند و ته نشین با حجم مناسبی (با توجه به غلظت BBMV) از بافر کربنات ۵۰ میلی مولار pH ۱۰/۵ مخلوط شد. مطالعات الیگومریزاسیون در وزیکول های مشتق شده از سلول های پوششی روده میانی با دو میکروگرم از پروتئین فعال شده و نشان دار شده ی Cry1Ia7 و پروتئین فعال شده ی Cry1Ab با پنج میکروگرم از BBMV مربوط به *L. botrana* و *L. decemlineata*، و ۲۰ میکروگرم از BBMV مربوط به *O. nubilalis* انجام گرفت. غلظت های مورد نظر از پروتئین و BBMV، در ۵۰ میکرولیتر از بافر کربنات ۵۰ میلی مولار pH ۱۰/۵ با هم مخلوط و به مدت یک ساعت، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. واکنش پروتئولیز با فنیل متیل سولفیل فلوراید (PMSF) یک میلی مولار متوقف گردید. در مورد شاهد پروتئین های Cry1Ab و Cry1Ia7 بدون حضور BBMV به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، شرایط مشابه تیمارها نگه داشته شدند. همچنین، شاهدی تنها شامل BBMV نیز در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، با سانتریفیوژ به مدت ۴۵ دقیقه، با دور $18400 \times g$ در دمای چهار درجه سلسیوس، BBMV ها در ته نشین جمع آوری گردید. رونشین که حاوی مونومرهای پروتئین و پروتئین های متصل نشده به غشاء بود، برای بارگذاری در ژل و مقایسه با ته نشین، نگه داشته شد. ته نشین با بافر کربنات ۵۰ میلی مولار pH ۱۰/۵ شسته و سانتریفیوژ شد. ته نشین نهایی، با ده میکرولیتر از بافر کربنات ۵۰ میلی مولار pH ۱۰/۵، مخلوط و به مدت سه دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. پروتئین های متصل شده و نشده به غشاء، روی ژل ده درصد

تفکیک و سپس به غشای PVDF منتقل شدند. مراحل وسترن بلات مشابه بخش قبل انجام گرفت. هر یک از آزمون‌های الیگومریزاسیون با استفاده از BBMV حداقل سه مرتبه تکرار شد.

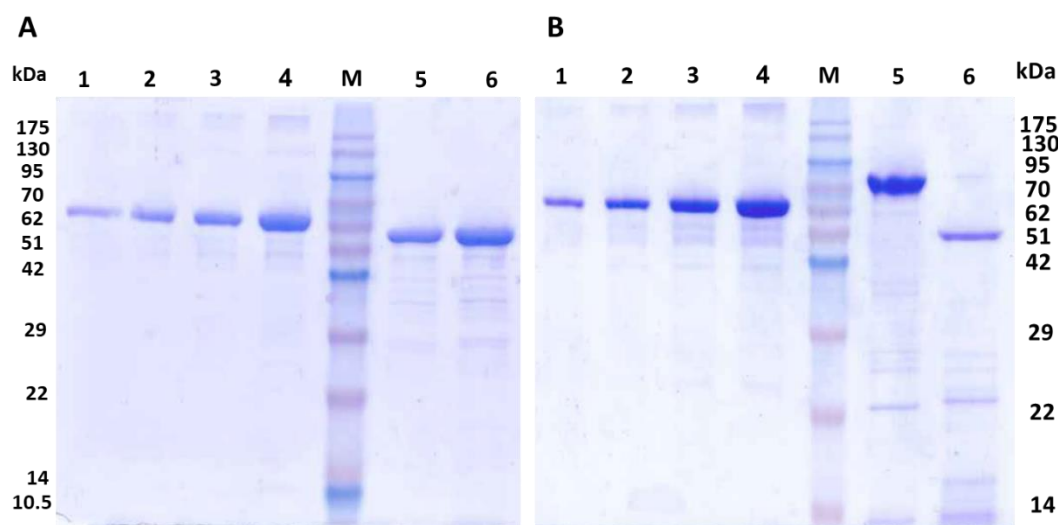
۵-۳- نتایج و بحث

۵-۳-۱- تشکیل ساختارهای الیگومری در پروتئین CryIIa

همان‌طور که پیش‌تر به آن اشاره شد، توکسین‌های گروه CryII با وجود اینکه در خانواده‌ی پروتئین‌های سه‌دومینی CryI قرار گرفته‌اند، ویژگی‌های منحصر به فردی دارند. درک کامل و صحیحی از نحوه‌ی عملکرد توکسین‌های CryII باکتری Bt برای افزایش کارایی آن‌ها در کنترل آفات گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. در مدل اتصال متوالی، تشکیل ساختارهای الیگومری مقدم بر اتصال توکسین به گیرنده‌های موجود در سلول‌های پوششی روده‌ی میانی، به‌عنوان مرحله‌ی اصلی در روند بیماری‌زایی توکسین‌های سه‌دومینی باکتری Bt شناخته شده است. بنابراین، در این رساله تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین CryIIa7، در ارتباط با میزبان‌های حساس و متحمل با روش western blot برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت.

۵-۳-۲- آماده‌سازی پروتئین‌های CryIIa7 و CryIAb

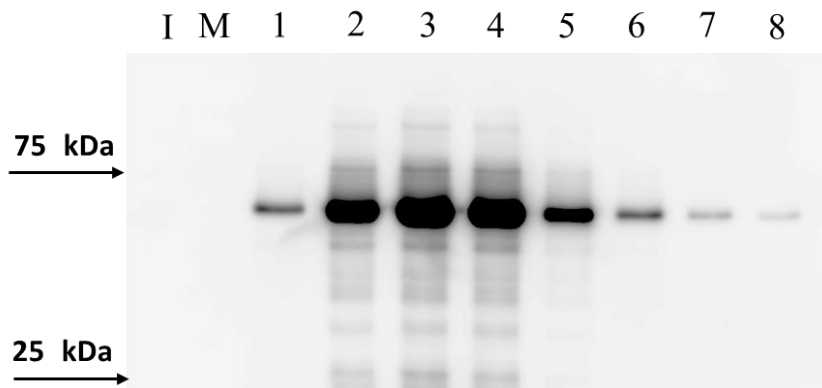
توکسین CryIIa7 در سلول‌های باکتری *E. coli* بیان گردید و پروتئینی با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون به دست آمد. پس از خالص‌سازی و فعال‌سازی پیش‌توکسین CryIIa7 با آنزیم تریپسین، توکسین فعالی با وزن مولکولی حدوداً ۵۰ کیلودالتون، حاصل گردید. توکسین فعال شده‌ی CryIAb با آنزیم تریپسین نیز، با روش کروماتوگرافی به وسیله‌ی ÄKTA explorer system، خالص‌سازی شد. کیفیت و کمیت توکسین فعال و خالص شده‌ی CryIAb، روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵-۱). برای تعیین غلظت باندهای مربوط به توکسین‌های فعال شده‌ی CryIIa7 و CryIAb، از چهار غلظت مختلف (۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) پروتئین استاندارد BSA، استفاده گردید. غلظت پروتئین‌های مورد مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار TotalLab و به روش چگالی‌سنجی، تخمین زده شد.



شکل ۵-۱- تهیه و خالص سازی توکسين هاي Cry. تصوير A: توکسين فعال و خالص شده ي Cry1Ab را نشان می دهد؛ شماره های ۱ تا ۴) چهار غلظت متفاوت از BSA: ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم/میلی لیتر، M؛ مارکر پروتئينی رنگی (Nippon genetics)، ۵ و ۶؛ توکسين فعال و خالص شده ي Cry1Ab. تصوير B: توکسين فعال و خالص شده ي Cry1Ia7 را نشان می دهد؛ شماره های ۱ تا ۴) چهار غلظت متفاوت از BSA؛ M؛ مارکر پروتئينی رنگی، ۵؛ پيش توکسين Cry1Ia7، و ۶؛ توکسين فعال و خالص شده ي Cry1Ia7.

۵-۳-۳- نشان دار کردن پروتئين Cry1Ia7 با بيوتين

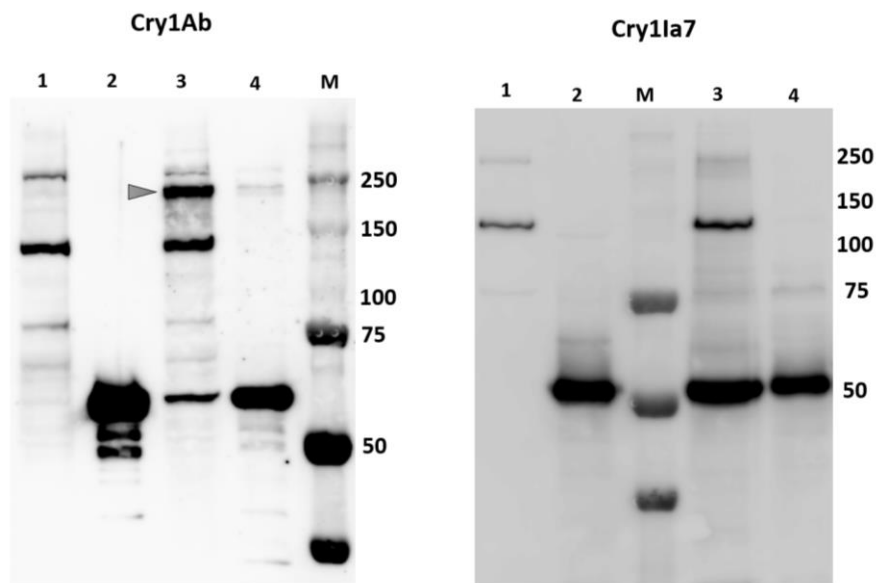
بعد از خالص سازی و فعال کردن توکسين Cry1Ia7 با آنزيم تريپسين، توکسين به دست آمده با بيوتين نشان دار گشت. صحت و درستی نشان دار شدن پروتئين Cry1Ia7، با western blot مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵-۲). پروتئين Cry1Ia7 نشان دار نشده (بدون اتصال بيوتين)، به عنوان شاهد در ژل بارگذاری گردید. انتظار می رفت همان طور که در شکل ۵-۲، lane مشخص شده با حرف I (input) آمده است، هيچ سيگنالی از اين پروتئين بعد از western blot، ثبت نگردد. Lane های شماره ي یک تا هشت، مربوط به بخش های متفاوت از پروتئين نشان دار شده که از ستون PD-10 عبور کرده اند، می باشد. سهم های دو، سه و چهار که حاوی غلظت مناسبی از پروتئين نشان دار شده با بيوتين می باشند، برای انجام آزمون های اليگومريزاسيون مورد استفاده قرار گرفتند. در نتیجه، نتایج western blot نشان می دهد که، پروتئين Cry1Ia7 به درستی نشان دار شده است.



شکل ۵-۲- نتیجه‌ی نشان دار کردن توکسین CryIIa7 با بیوتین. حرف I؛ پروتئین بدون نشان (input)، حرف M؛ مارکر مولکولی و شماره‌های یک تا هشت؛ پروتئین‌های نشان دار CryIIa7، را نشان می‌دهد.

۵-۳-۴- تشکیل ساختارهای الیگومری با استفاده از رده‌ی سلولی

تشکیل ساختارهای الیگومری با استفاده از رده‌ی سلولی حشرات، با انکوبه کردن توکسین فعال شده‌ی Cry1Ab و CryIIa7، با سلول‌های Sf21 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که، برای پروتئین Cry1Ab، دو باند اصلی ۶۰ و ۲۵۰ کیلوالتون، به ترتیب متناظر با ساختارهای مونومری و الیگومری مشاهده گردید. در حالی که، برای پروتئین CryIIa7، تنها فرم مونومری متصل به غشاء تشخیص داده شد و هیچ الیگومری مشاهده نگردید (شکل ۵-۳). نتیجه آنکه، توکسین CryIIa7 بعد از انکوبه شدن با سلول‌های Sf21، ساختارهای الیگومری تشکیل نمی‌دهد، در حالی که این ساختارها به وضوح در مورد توکسین Cry1Ab قابل تشخیص است. همان‌طور که در شکل ۵-۳ آمده است، بخشی از توکسین‌های Cry1Ab و CryIIa7، به غشای سلول‌های Sf21 متصل نگردیده و در بخش رونشین به صورت محلول شناسایی شده‌اند. در lane مربوط به سلول‌های Sf21، سیگنال‌هایی مشخص شده است، که احتمالاً حاصل از برهم‌کنش آنتی‌بادی با برخی از پروتئین‌های موجود در غشای سلول‌های Sf21 می‌باشد.



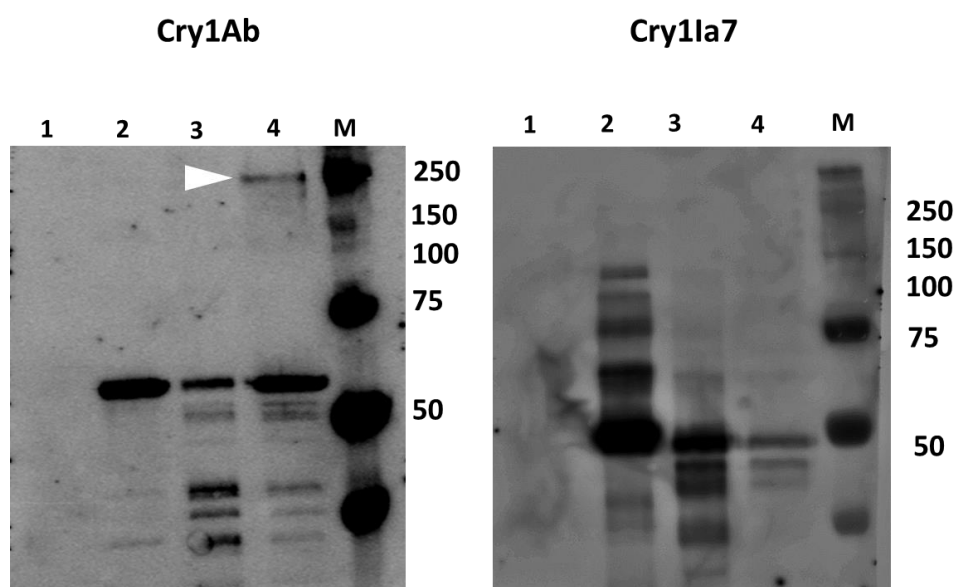
شکل ۵-۳- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط سلول‌های Sf21. شماره‌های ۱؛ سلول‌های Sf21، شماره‌های ۲؛ پروتئین‌های مورد استفاده قبل از انکوبه کردن، شماره-های ۳؛ پروتئین‌های متصل شده به غشاء، شماره‌های ۴؛ رونشین (پروتئین‌های محلول و غیر متصل به غشاء) و حروف M؛ مارکرهای مولکولی را نشان می‌دهد. پیکان موجود در تصویر مربوط به پروتئین Cry1Ab، به الیگومر ۲۵۰ کیلو دالتونی توکسین Cry1Ab، اشاره می‌کند.

۵-۳-۵- تشکیل ساختارهای الیگومری با استفاده از BBMV

تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین Cry1Ia7، بعد از انکوبه کردن پروتئین با قطعاتی از غشای سلولی میزبان‌های حساس *L. botrana* و *L. decemlineata* و غیر حساس *O. nubilalis*، برای اولین بار، در این رساله، مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، ارتباط بین زهرآگینی و تشکیل ساختارهای الیگومری در دو توکسین Cry1Ab و Cry1Ia7 مطالعه و بحث گردید.

به منظور تأیید صحت پروتکل مورد استفاده برای بررسی تشکیل ساختارهای الیگومری، ابتدا از BBMV حاصل از *O. nubilalis*، به عنوان میزبان حساس برای توکسین Cry1Ab، استفاده گردید. نتیجه حاکی از آن بود که، بعد از انکوبه کردن پروتئین Cry1Ab با BBMV حاصل از *O. nubilalis*، سیگنالی با وزن مولکولی تقریباً ۲۵۰ کیلو دالتون، با آنتی‌بادی اختصاصی چندهم‌ساده‌ای اولیه‌ی anti-Bt Cry1Ab/1Ac، آشکار گردید.

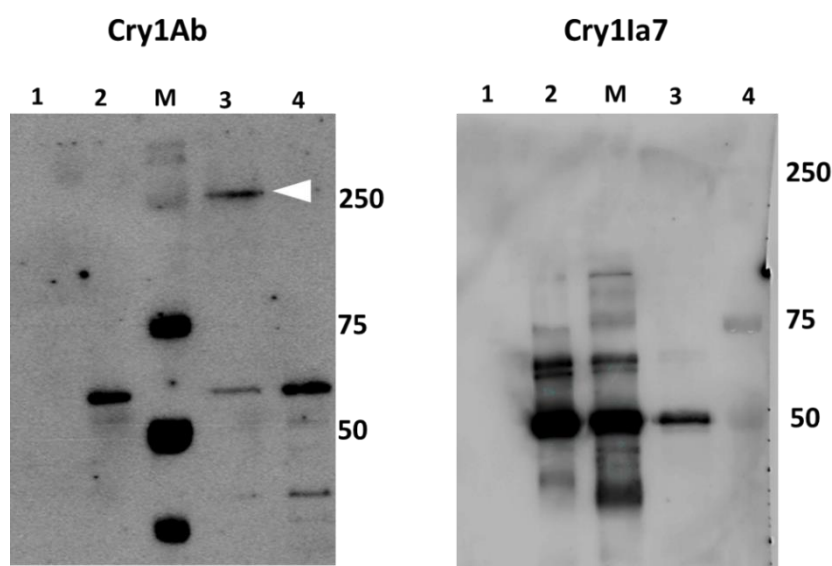
اما، تحت شرایط یکسان، ساختار الیگومری برای توکسین Cry1Ia7، شناسایی نگردید و تنها سیگنال مربوط به مونومرهای ۵۰ کیلودالتونی توکسین Cry1Ia7 متصل شده به قطعات غشاء مشاهده شد (شکل ۵-۴). نتیجه آنکه، توکسین Cry1Ia7، در برابر BBMV حاصل از میزبان غیر حساس، *O. nubilalis*، الیگومر تشکیل نمی‌دهد.



شکل ۵-۴ - تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین‌های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط BBMV حاصل از *O. nubilalis*. شماره‌های ۱؛ BBMV، شماره‌های ۲؛ پروتئین‌های مورد استفاده قبل از انکوبه کردن، شماره‌های ۳؛ پروتئین‌های متصل شده به غشاء، شماره‌های ۴؛ رونشین (پروتئین‌های محلول و غیر متصل به غشاء) و حروف M؛ مارکرهای مولکولی را نشان می‌دهد. پیکان موجود در تصویر مربوط به پروتئین Cry1Ab، به الیگومر ۲۵۰ کیلودالتونی توکسین Cry1Ab، اشاره می‌کند.

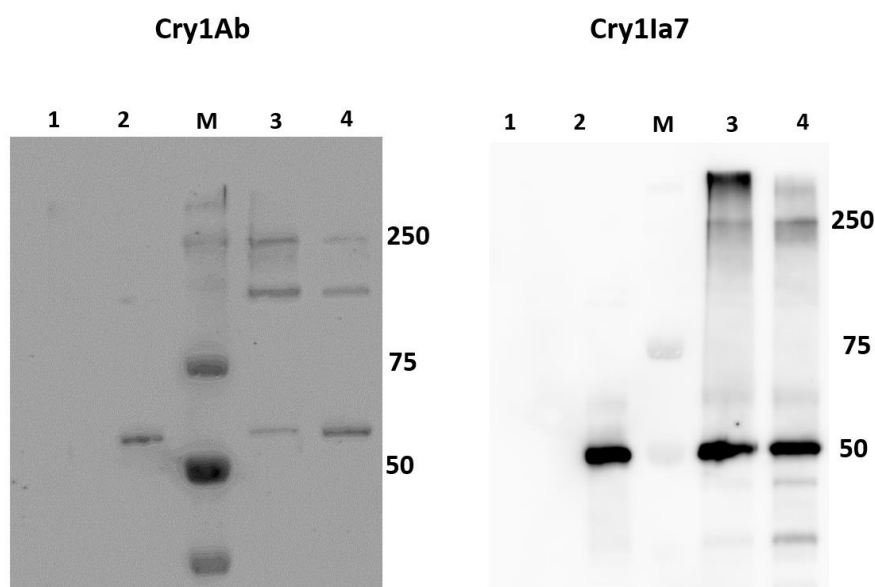
در مرحله‌ی بعدی، اهمیت الیگومریزاسیون در زهر آگینی توکسین Cry1Ia7، بعد از انکوبه کردن پروتئین با قطعات غشای دو میزبان حساس از دو راسته‌ی متفاوت بال‌پولکداران و سخت‌بالپوشان، مطالعه گردید. از راسته‌ی بال‌پولکداران، *L. botrana* به‌عنوان میزبان حساس برای هر دو پروتئین Cry1Ab و Cry1Ia7، انتخاب گردید. بعد از انکوبه کردن دو میکروگرم از پروتئین نشان‌دار شده‌ی Cry1Ia7 با پنج میکروگرم از BBMV حاصل از *L. botrana*، هیچ ساختار الیگومری متصل به غشای سلولی در تهنشین، بازیابی نگردید، در حالی که، در شرایط مشابه، مقدار قابل ملاحظه‌ای از الیگومرهای Cry1Ab، شناسایی شد. در رونشین، مونومرهای محلول و غیر

متصل به غشاء، برای هر دو پروتئین، مشاهده گردید (شکل ۵-۵). نکته قابل توجه آنکه، در این آزمایش، سیگنال مربوط به مونومرهای Cry1Ia7 متصل به غشاء، بسیار قوی تر از مونومرهای Cry1Ab متصل به غشاء می باشد، که اشاره به اتصال بیشتر مونومرهای Cry1Ia7 به غشاء می کند. همچنین، در برخی از تکرارهای این آزمایش، طی انکوبه کردن توکسین Cry1Ia7 با BBMV حاصل از *L. botrana*، باند بسیار ضعیفی با وزن مولکولی بیش از ۲۵۰ کیلو دالتون، به طور نامنظم مشاهده می گشت. این الیگومر، نشان دهنده ی ساختارهایی با بیش از پنج الی شش واحد بود، که بزرگ تر از الگومرهای معمول تترامر بود. از طرف دیگر، توکسین Cry1Ia7، بر خلاف توکسین Cry1Ab، با پروتئین های مربوط به قطعات غشای سلولی *L. botrana*، پروتئولیز شد، به طوری که با افزایش غلظت BBMV، از ۵ میکروگرم به ۲۰ میکروگرم، غلظت مونومرهای متصل شونده به غشاء و محلول در روئشین، کاهش یافت، و در غلظت ۲۰ میکروگرم BBMV، سیگنال بسیار ضعیفی از مونومرها، قابل شناسایی بود.



شکل ۵-۵ - تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین های Cry1Ab و Cry1Ia7 القاء شده توسط BBMV حاصل از *L. botrana* شماره های ۱؛ BBMV، شماره های ۲؛ پروتئین های مورد استفاده قبل از انکوبه کردن، شماره های ۳؛ پروتئین های متصل شده به غشاء، شماره های ۴؛ روئشین و حروف M؛ مارکرهای مولکولی را نشان می دهد. پیکان موجود در تصویر مربوط به پروتئین Cry1Ab، به الیگومر ۲۵۰ کیلو دالتونی توکسین Cry1Ab، اشاره می کند.

همان طور که پیشتر اشاره شد، توکسین CryIIa7، فعالیت دوگانه در برابر میزبان های بال پولکداران و سخت بالپوشان دارد. در نتیجه، از قطعاتی از سلول های پوششی روده میانی *L. decemlineata*، به عنوان میزبان حساس برای توکسین CryIIa7 و غیر حساس برای توکسین CryIAb استفاده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، برای هر دو توکسین، باندی با وزن مولکولی زیاد، مربوط به ساختارهای الیگومری، هم در ته نشین به صورت متصل به غشاء و هم در روئشین، محلول و غیر متصل به غشاء تشخیص داده شد. سیگنال هایی با وزن مولکولی متناظر با مونومرهای هر دو توکسین نیز مشاهده گردید. از انکوبه کردن پروتئین CryIAb با BBMV حاصل از *L. decemlineata*، باندی با اندازه ی ۲۵۰ کیلودالتون، مربوط به الیگومر چهارتایی و هم چنین باندی با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلودالتون متناظر با الیگومر دوتایی (دایمر)، شناسایی شد. در مورد توکسین CryIIa7، مشاهده ی باند ۲۵۰ کیلودالتونی، نشان دهنده ی تشکیل الیگومری با ۵ الی ۶ واحد مونومر می باشد. زیرا مونومرهای CryIIa7، اندازه ی کوچک تری نسبت به مونومرهای CryIAb، دارند. هم چنین، تجمعی از مونومرهای CryIIa7، با وزن مولکولی بیش از ۲۵۰ کیلودالتون، در تصویر CryIIa7 مشاهده می شود (شکل ۵-۶).



شکل ۵-۶- تشکیل ساختارهای الیگومری توکسین های CryIIa7 و CryIAb القاء شده توسط BBMV حاصل از *L. decemlineata* شماره های ۱؛ BBMV، شماره های ۲؛ پروتئین های مورد استفاده قبل از انکوبه کردن، شماره های ۳؛ پروتئین های متصل شده به غشاء، شماره های ۴؛ روئشین و حروف M؛ مارکرهای مولکولی را نشان می دهد.

پروتئین‌های CryII، ساختار سه دومینی مشابهی با سایر پروتئین‌های Cry دارند، بنابراین، به نظر می‌رسد که، با وجود ویژگی‌های به‌خصوص پروتئین‌های CryII، از جمله؛ عدم تجمع در کریستال‌ها، وزن مولکولی کم پروتوکسین و فعالیت دوگانه برای آفات بال‌پولکدار و سخت‌بالپوش، نحوه‌ی اثر این پروتئین‌ها نیز مشابه سایر هم‌تایان خود باشد. هدف از انجام این بخش از رساله، بررسی مرحله‌ی تشکیل الیگومر و ارتباط بین این مرحله با زهرآگینی توکسین CryIIa7 بود. مطالعات متعددی در مورد اهمیت و ضرورت مرحله‌ی تشکیل الیگومر در فعالیت حشره‌کشی توکسین‌های Cry باکتری Bt، انجام گرفته است (Tingue et al., 2001; Likitvivatanavong et al., 2005; Jiménez-Juárez et al., 2007; Portugal et al., 2014). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که، زهرآگینی موتانت‌هایی از توکسین‌های Cry، که توانایی تشکیل ساختارهای الیگومری ندارند، به‌شدت کاهش یافته است (Tingue et al., 2001; Herrero et al., 2004; Jiménez-Juárez et al., 2007). هم‌چنین نشان داده شده است که، موتانت‌های Cry1A که فعالیت حشره‌کشی خود را از دست داده‌اند، توانایی تولید الیگومر ندارد (Rodríguez-Almazán et al., 2009; Portugal et al., 2014).

در این رساله، الیگومریزاسیون پروتئین‌های CryIIa7، بعد از انکوبه شدن با BBMV میزبان‌های حساس و غیر حساس و هم‌چنین رده‌ی سلولی حشرات، برای اولین بار در دنیا، با استفاده از تکنیک وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت. هم‌چنین این مطالعه، اولین مقایسه‌ی تشکیل ساختارهای الیگومری در میزبان‌های حساس و غیر حساس می‌باشد، مطالعات پیش از این، به بررسی تشکیل و مقایسه‌ی ساختارهای الیگومری روی میزبان‌های حساس و مقاوم یک گونه آفت پرداخته و ارتباط بین الیگومریزاسیون و مقاومت را مورد مطالعه قرار داده‌اند (Ocelotl et al., 2015; Ocelotl et al., 2017). نشان داده شده است که، توکسین‌های مهندسی شده‌ی Cry1A (هم موتانت‌ها و هم پروتئین‌های تغییر یافته) که فعالیت حشره‌کشی خود را حفظ کرده‌اند، توانایی تشکیل الیگومر را نیز، دارند. در پژوهش حاضر از توکسین Cry1Ab، به‌عنوان پروتئین شاهد استفاده گردید. زیرا، ضمن مطالعات بی‌شماری که روی این پروتئین انجام گرفته است، تشکیل ساختارهای الیگومری در این توکسین اثبات شده است (Rausell et al., 2004; Gómez et al., 2014; Portugal et al., 2014; Nair and Dean 2015; Tanaka et al., 2016). بر اساس نتایج به دست آمده در این رساله، توکسین Cry1Ab، با تشکیل ساختار تترامری با وزن مولکولی ۲۵۰ کیلودالتون، بدون توجه به حساسیت میزبان، الیگومریزه می‌شود. به

این مفهوم که، پس از انکوبه کردن این پروتئین با قطعاتی از غشای سلول‌های میزبان‌های حساس؛ *O. nubilalis* و *L. botrana*، و میزبان‌های غیر حساس *L. decemlineata* و سلول‌های Sf21، ساختارهای الیگومری پروتئین Cry1Ab مشاهده گردید. این مشاهدات را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که، الیگومرهای توکسین Cry1Ab، بعد از انکوبه شدن این پروتئین با میزبان‌های حساس و غیر حساس، شکل می‌گیرد، اما اثربخشی الیگومرهای تولیدی در تخریب سلول‌هایی که در معرض آن‌ها قرار گرفته‌اند، متفاوت است، در نتیجه در میزبان‌های غیر حساس باعث القای مکانیسم‌های مرگ سلول و تشکیل صحیح منافذ نمی‌شود.

بر اساس نتایج به دست آمده، الیگومرهای توکسین Cry1Ab عموماً در ته‌نشین و متصل به غشای سلول یافت شدند، اما بعد از اینکه توکسین در معرض BBMV حاصل از میزبان غیر حساس، *L. decemlineata* قرار گرفت، الیگومرها در رونشین نیز، به صورت محلول یافت شدند. الیگومر توکسین Cry1Ia7 نیز، بعد از انکوبه شدن پروتئین با BBMV میزبان سخت‌بالپوش حساس، *L. decemlineata*، مشاهده گشت. توجه به وزن مولکولی الیگومر یافت شده از توکسین Cry1Ia7، نشان می‌دهد که این الیگومر، بر خلاف الیگومر چهار واحدی Cry1Ab، از پنج الی شش واحد مونومر تشکیل شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، زمانی که پروتئین Cry1Ia7 در معرض BBMV میزبان حساس *L. botrana* قرار داشت، در ته‌نشین، تنها فرم مونومری متصل به غشاء، مشاهده گردید. بنابراین، بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ارتباط واضح و مشخصی بین زهرآگینی و تشکیل ساختارهای الیگومری در توکسین Cry1Ia7، یافت نگردید.

در مورد آفت *L. decemlinata*، علاوه بر تترامرهای Cry1Ab، دایمرها نیز متصل به BBMV این آفت و همچنین به صورت محلول و غیر متصل در رونشین، شناسایی شدند. اما این ساختارهای تترامری و دایمری توانایی الحاق به غشاء، تشکیل منفذ و نهایتاً زهرآگینی ندارند. با توجه به اینکه، توکسین Cry1Ab برای *L. decemlineata*، زهرآگینی ندارد، نتایج به دست آمده در این بخش از رساله مشابه نتایج Rodríguez-Almazán و همکاران (۲۰۰۹)، می‌باشد. در پژوهش نام برده شده، از موتانت‌هایی از توکسین Cry1Ab استفاده شده که بخشی از مارپیچ آلفای چهار، در دومین I، تغییر یافته است. جهش ایجاد شده، روی الحاق توکسین به

غشاء و تشکيل منفذ، اثرگذار است، که در نتيجه منجر به کاهش شديد فعاليت حشره کشي اين موتانت ها در برابر لاروهای *Manduca sexta* می شود.

بعد از اينکه توکسين Cry1Ia7 در معرض BBMV حاصل از *L. decemlineata* قرار گرفت، مشابه نتايج Guo و همکاران (۲۰۰۹) توده ای از مونومرهای توکسين يافت شد. تشکيل ساختارهای اليگومري در توکسين Cry1Ie، پس از قرار گرفتن توکسين در معرض گلو تارالديئيد^۱ و سپس جداسازی مونومرها و اليگومرهای به وجود آمده با کروماتوگرافي اندازه-طردی^۲ مورد بررسی قرار گرفت (Guo et al., 2009). نتايج حاکی از آن بود که توکسين Cry1Ie، توليد اليگومرهایي به صورت دايمر و تترامر (و حتی بزرگ تر از تترامر) می کند. نتايج زيست سنجی نشان داد که اليگومرهای Cry1Ie، زهرآگيني کمتری نسبت به مونومرهای اين توکسين عليه لاروهای *P. xylostella* داشتند.

به طور خلاصه نتايج به دست آمده در اين بخش از رساله نشان می دهد که اليگومرهای توکسين Cry1Ab، بعد از انکوبه شدن با قطعاتی از سلول های ميزبان های حساس و غير حساس، تشکيل می شود. در حالی که در مورد توکسين Cry1Ia7، تنها بعد از انکوبه کردن پروتئين با ميزبان حساس سخت بالپوش، *L. decemlineata*، ساختارهای اليگومري تشکيل شدند و هيچ اليگومري بعد از اينکه پروتئين در معرض ميزبان های حساس و غير حساس بال پولکدار قرار گرفت، تشکيل نشد. بنابراین، در نحوه ای اثر توکسين های Cry سه دوميني، بر اساس مدل اتصال متوالی، تشکيل اليگومر برای همه ی توکسين های Cry و تمامی آفات ميزبان، عموميت ندارد. بر اساس نتايج اين رساله، تشکيل اليگومر مرحله ای مهم، اما نه لزوماً ضروری، برای زهرآگيني توکسين Cry1Ia7 می باشد.

¹ Glutaraldehyde

² Size-exclusion chromatography

بر اساس نتایج به دست آمده در این فصل مشخص شد، به دلیل نحوه‌ی اثر متفاوت توکسین CryIIa و ویژگی‌های منحصر به فرد این توکسین، امکان استفاده هم‌زمان از این توکسین با سایر توکسین‌های Bt برای افزایش کارایی آفت‌کش‌ها و مدیریت بروز مقاومت آفات، وجود دارد. به علاوه این توکسین از پتانسیل مناسبی برای استفاده در گیاهان تراریخت به همراه سایر توکسین‌های Bt برخوردار می‌باشد. تا این قسمت از رساله، طی بررسی ویژگی‌های سویه‌های ایرانی باکتری Bt، ردیابی و هم‌سانه‌سازی ژن‌های جدید؛ سویه‌های AzLp، IE-2 و IP-2 و همچنین ژن جدید حشره‌کش *cryIIa38* برای کنترل آفات بال‌پولکدار معرفی شدند. با در نظر گرفتن پتانسیل بالای حشره‌کشی سویه‌های نام برده شده و توکسین CryIIa38، امکان استفاده از آن‌ها به ترتیب در آفت‌کش‌های زیستی بر پایه‌ی Bt و محصولات Bt وجود دارد. اما پیش از توصیه‌ی استفاده از سویه‌های AzLp، IE-2 و IP-2 و توکسین CryIIa38، در کنترل آفات بال‌پولکدار، این پرسش مطرح شد که آیا سویه‌های باکتریایی مورد نظر فعالیت ضد میکروبی علیه سایر قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز دارند؟ به عبارتی آیا سویه‌های Bt در حین مدیریت جمعیت آفات، توانایی کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی را نیز دارند؟ در فصل بعد تلاش گردید تا به پاسخی برای این پرسش‌ها ارائه شود.

فصل هشتم

بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتری Bt

فصل ششم: بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتری Bt

۶-۱- مقدمه

دلنا اندوتوکسین باکتری Bt علاوه بر فعالیت حشره‌کشی، آنتاگونیست برخی از عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز می‌باشد. فعالیت ضد قارچی پنج سویه از باکتری Bt که پیش‌تر فعالیت حشره‌کشی آن‌ها نیز ثابت شده بود، برای کنترل *Fusarium reseau* var. *sambucinum* آزمون گردید (Safdi et al., 2001). پنج سویه‌ی انتخابی از باکتری Bt، توانایی کنترل قارچ بیمارگر گیاهی را در شرایط *in vitro* نداشتند. در حالی که در شرایط *in vivo*، بین ۴۱ تا ۵۲ درصد بیمارگی پوسیدگی نرم را روی غده‌های سیب‌زمینی کنترل کردند.

فعالیت ضد میکروبی اندوتوکسین‌ها و پروتئین‌های با وزن مولکولی کم (۳۳ تا ۳۶ کیلودالتون) باکتری *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ثابت شده است (Yudina et al., 2003).

در پژوهش Dong و همکاران (۲۰۰۴) مشخص شد که باکتری گرم مثبت Bt در سیگنال‌های سیستم سنجش حدنصاب حساسیت باکتری گرم منفی *Erwinia carotovora* اختلال ایجاد می‌کند که این اختلال باعث کاهش شدید بیمارگری این باکتری می‌شود. تمام هفت سویه Bt مورد مطالعه در پژوهش نام برده شده، توانایی کنترل بیماری پوسیدگی نرم را هم روی برش‌هایی از غده سیب‌زمینی و هم روی بافت‌هایی از گیاه داشتند. بر اساس گزارش Kim و همکاران (۲۰۰۴)، سویه CMB26 از باکتری Bt، تولید لیپوپپتیدی می‌کند که فعالیت ضد قارچی علیه عامل آنتراکنوز درختان، قارچ *Colletotrichum gloeosporioides*، دارد.

پروتئین‌هایی به دست آمده از کریستال‌های سویه *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* با وزن مولکولی ۳۴ و ۳۶ کیلودالتون، فعالیت ضد میکروبی در برابر *Micrococcus luteus* و بازدارندگی رشد برای *Streptomyces chrysomallus* داشتند (Revina et al., 2005).

کیتیناز باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* رشد میسلیمی قارچ *Aspergillus niger* که باعث ایجاد کپک سیاه روی پیاز و بادام‌زمینی می‌شود، را مهار می‌کند (Driss et al., 2005).

غده های سیب زمینی تیمار شده با سویه های از باکتری Bt در تحقیق Zhang و همکاران (۲۰۰۷)، نسبت به بیماری پوسیدگی نرم ایجاد شده توسط *E. carotovora* مقاوم شدند.

سویه های Bt مورد استفاده در پژوهش Choi و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت قارچ کشی زیادی در برابر سفیک پودری جو و خیار و در عین حال فعالیت حشره کشی در مقابل *P. xylostella* و *A. aegypti* از خود نشان دادند.

فعالیت ضد قارچی سویه ی *B. thuringiensis* GS1، در مقابل قارچ *R. solani* مورد بررسی قرار گرفت. رونشین کشت باکتریایی سویه ی مورد نظر به شدت مانع رشد میسلیمی قارچ بیمارگر گیاهی شد (Dong- Jun et al., 2012).

در کلنی هایی از قارچ *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* که تحت تأثیر دلتا-اندوتوکسین باکتری *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* بودند، نرخ رشد و اسپورزایی به طور معنی داری کاهش یافته و تغییراتی در شکل و رنگ کلنی های قارچ مشهود بود. در بررسی اثر حفاظتی دلتا-اندوتوکسین برای میوه های گوجه فرنگی در برابر قارچ *Fusarium* از در طی انبارداری مشخص شد در میوه هایی که خسارت اولیه قارچ کم بود، بلایت دیررس هم به طور معنی داری کاهش پیدا کرده بود (Kamenek et al., 2012).

در پژوهش محمد و همکاران (۲۰۱۳) رشد میسلیمی قارچ *Rhizoctonia solani* بعد از تلقیح با سویه هایی از باکتری Bt، Bt D-1 و Bt HD-203، به شدت کاهش یافت. هم چنین تلقیح قارچی نشاء های پنبه ای که پیشتر با مخلوطی از اسپور و کریستال باکتری Bt تیمار شده بودند، نشان داد که نه تنها شدت بیماری قارچی به شدت کاهش می یابد بلکه رشد ریشه و جوانه های پنبه هم به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش می یابد.

نشان داده شده سویه ی اندوفیت KB1 از باکتری Bt که از شیرهی خام گیاه *Arabidopsis thaliana* جداسازی شده بود، به شدت مقاومت گیاه گوجه فرنگی را نسبت به *Botrytis cinerea* و *Pseudomonas syringae* افزایش می دهد (Hong et al., 2015).

فعالیت کیتینازی سویه *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DMS-2803 علیه قارچ *C. gloeosporioides* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت اصلی کیتینازی در این سویه از باکتری Bt مربوط به آنزیم اندوکیتیناز می‌باشد (Fuente-Salcido et al., 2016).

فعالیت ضد قارچی ۱۳۷ سویه‌ی الجزایری از باکتری Bt در برابر پنج قارچ بیمارگر گیاهی؛ *Aspergillus niger* sp.، *Colletotricum* sp.، *Monilia* sp.، *Thielaviopsis* sp. و *Fusarium* sp. و چهار باکتری بیمارگر *Staphylococcus aureus* تیپ وحشی (SM) و سویه‌ی مقاوم به متیسیلین^۱ (RM)، و دو باکتری گرم منفی *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفته است (Djenane et al., 2017). بر اساس نتایج به دست آمده، تقریباً تمامی سویه‌های انتخابی (۱۳۵ از ۱۳۷ سویه) حداقل علیه یکی از قارچ‌های انتخابی، فعالیت ضد قارچی داشتند. در مورد فعالیت ضد باکتریایی تنها ۲۹/۹ درصد از سویه‌ی باکتری Bt در برابر حداقل یکی از باکتری‌های بیمارگر انتخابی، فعال بودند.

سویه‌های باکتری Bt مورد استفاده در مطالعه Hollensteiner و همکاران (۲۰۱۷) توانایی مهار کردن رشد میسلیمی قارچ‌های *Verticillium longisporum* و *V. dahliae* را داشتند. تمام سویه‌های Bt مورد بررسی اثر آنتاگونیستی معنی‌داری بر روی قارچ *V. dahliae* از خود نشان دادند.

فرضیه‌ی مورد بررسی در این فصل از رساله به این ترتیب بود که، سویه‌های ایرانی باکتری Bt فعالیت ضد میکروبی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد بررسی را دارند.

۶-۲- مواد و روش‌ها

در این بخش فعالیت ضد میکروبی توکسین‌ها و هفت سویه‌ی انتخابی از باکتری Bt روی عوامل بیمارگر گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی فعالیت ضد قارچی احتمالی سویه‌های باکتری Bt از قارچ بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici*، تهیه شده توسط کلینیک گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران استفاده

^۱ Methicillin

گردید. فعالیت ضد باکتریایی توکسین‌های باکتری Bt روی باکتری بیمارگر گیاهی *Erwinia sp.* تهیه شده توسط بخش بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه مورد بررسی قرار گرفت.

۶-۲-۱- بررسی فعالیت ضد قارچی

اثر توکسین‌های سویه‌های انتخابی باکتری Bt، روی قارچ بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. اثر سویه‌های باکتری Bt، به صورت مستقیم و غیر مستقیم مطالعه گردید. در اثر غیر مستقیم، وجود ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز، آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کیتین، که عامل اصلی فعالیت ضد قارچی سویه‌های باکتری Bt هستند، بررسی گردید. همچنین در اثر مستقیم، اثری که توکسین و سلول‌های باکتریایی روی رشد قارچ *Fusarium* دارند، مطالعه شد.

۶-۲-۱-۱- انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس برای ردیابی ژن‌های کیتیناز

دی.ان.ای ژنومی سویه‌های باکتری Bt، همان‌طور که پیشتر توضیح داده شده است، استخراج گردید. سپس، آغازگرهای مناسبی (جدول ۶-۱) برای تکثیر دو ژن اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز، به شرکت Sigma-Aldrich سفارش داده شد (Djenane et al., 2017). وجود ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز، در هفت سویه‌ی انتخابی از باکتری Bt، مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط واکنش و برنامه‌ی حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس مطابق جداول زیر تهیه و تنظیم (۶-۲ و ۶-۳) گردید. محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند و توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده، تعیین شد.

جدول ۶-۱- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز

Product size (bp)	T _m (°C)	Primer sequence (5'-3')	Target gene	Primer
1997	50	ATTCACACTGCTATTACTATC	Endo-chitinase	Chit (f)
	68.7	TGACGGCATT TAAAAGTTTCGGC		Chit (r)
1083	50.2	GATGT TAAACAGGTTCAA	Exo-chitinase	Chit36 (f)
	52.9	TTATTTT TGCAAGGAAAG		Chit36 (r)

جدول ۶-۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر ژن‌های کیتیناز

Components	Initial concentration	Used volume (μl)	Final concentration
10X reaction buffer (50 mM MgCl ₂)	10X	2.5	1X
<i>taq</i> DNA polymerase Biotools	1U/μl	1	0.04 U/μl
dNTPs mix	10 mM	1	0.4 mM
Forward primer	10 μM	1	0.4 μM
Reverse primer	10 μM	1	0.4 μM
Template DNA	100 ng/μl	1	4 ng/μl
Sterile bidistilled water		17	
Total volume		25	

جدول ۶-۳- برنامه حرارتی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تکثیر ژن کیتیناز

Cycle step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94	4 min	1
Denaturation	94	40 sec	35
Annealing	50	1 min	
Extension	72	1-2 min (60 sec / 1Kbp)	
Final extension	72	10 min	1

۶-۲-۱-۲- استفاده از روش کشت دوتایی

فعالیت ضد قارچی سویه‌های باکتری Bt، به روش کشت دوتایی^۱ (Knaak et al., 2007) با اندکی تغییرات، مورد بررسی قرار گرفت. قارچ *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* روی محیط کشت عمومی قارچ‌ها، Potato Dextrose Agar (PDA)، کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه داشته شد. پلاگ‌هایی به قطر شش میلی‌متر از کشت قارچی تهیه و از محیط جدا گردید. سویه‌های باکتری Bt نیز در محیط غذایی آگار کشت شدند و پلاگ‌هایی نیز به قطر شش میلی‌متر از کشت باکتری که تنها دربرگیرنده‌ی یک تک کلونی بودند، تهیه گشت. روش کشت دوتایی به مفهوم کشت قارچ و باکتری در یک ظرف پتری، تحت شرایط مناسب برای رشد قارچ است. پلاگ‌های قارچی و باکتریای تهیه شده، به کمک تیپ‌های استریل، به یک ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA، منتقل شد. به این ترتیب که پلاگ قارچی به مرکز محیط کشت منتقل شد و سپس سه پلاگ باکتریای، که هر کدام متعلق به یک سویه از باکتری Bt، بودند، به صورت شعاعی، در فاصله‌ی ۲/۵ سانتی‌متری از مرکز ظرف پتری قرار داده شدند. موقعیت چهارم در ظرف پتری، به‌عنوان شاهد منفی، خالی در نظر گرفته شد، تا بیشترین میزان رشد قارچ را ثبت کند. در این آزمون از سویه HD1 از باکتری Bt، به‌عنوان سویه مرجع یا استاندارد استفاده گردید. ظروف پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. سپس، رشد شعاعی قارچ در مواجهه با سویه‌های باکتریایی با مقایسه با شاهد اندازه‌گیری گردید. اثر ضد قارچی جدایه‌های باکتری Bt به‌عنوان هاله‌ی بادارنده تخمین زده شد.

۶-۲-۲- بررسی فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های باکتری Bt

فعالیت ضد باکتریای سویه‌های Bt، به این ترتیب مورد بررسی قرار گرفت که، باکتری مدل یا *Erwinia* sp. روی محیط غذایی آگار کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، سوسپانسیون باکتریایی از باکتری *Erwinia* sp. با غلظت 10^8 CFU/ml، تهیه و به‌عنوان مایه تلقیح برای تهیه‌ی کشت چمنی روی محیط غذایی آگار استفاده شد. برای کشت چمنی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به سطح محیط غذایی آگار ریخته و با استفاده از میله‌ی کشت، سوسپانسیون به طور یکنواخت، در سطح محیط کشت

^۱ Dual culture method

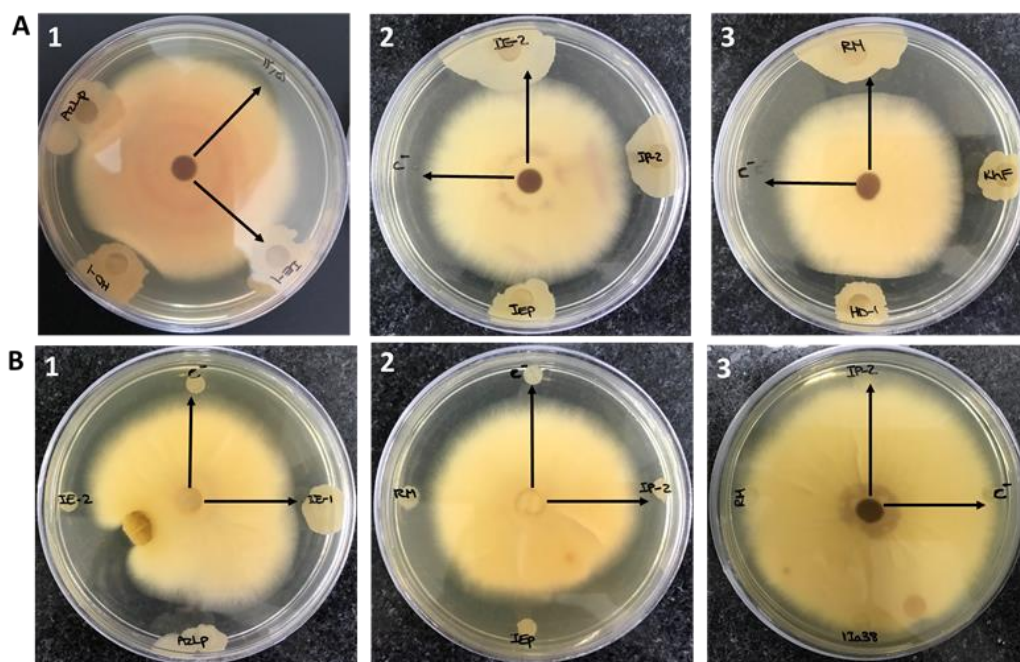
بخش گرديد. پلاگ هاي از سويه هاي باکتری Bt تهيه و تحت شرايط استريل به صورت شعاعي به ظرف پتری تهيه شده، منتقل گشت. همانند قسمت قبل، يک موقعيت روی محيط غذايي آگار به عنوان شاهد، خالي نگه داشته شد تا حداکثر رشد باکتری *Erwinia spp.* ثبت گردد. ظروف پتری تهيه شده، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه سلسيوس نگه داشته شدند. ميزان رشد باکتری در مواجهه با سويه هاي باکتری Bt اندازه گيري و با شاهد مقايسه گرديد.

۳-۶- نتايج و بحث

يافتن فرمولاسيوني بر پايه ي Bt که برای آفات و بيمارگرهاي گياهي زهرآگين باشد، به راحتی در خاک تجزيه شود و هزينه توليدي نسبتاً مناسبی داشته باشد، به عنوان جايجزين ترکيبات شيميایي برای کنترل آفات و بيماری هاي گياهي، بسيار با ارزش است. در نتيجه، در اين بخش از رساله، با توجه به يافتن سويه هاي مناسب از باکتری Bt، با دامنه ي فعاليت حشره کشي وسيع روی آفات بال پولکدار، بر آن شديم، دامنه ي فعاليت ضد ميکروبي سويه هاي کاندید را نيز آزمون کنيم.

۳-۶-۱- فعاليت ضد قارچي سويه هاي Bt

فعاليت ضد قارچي سويه هاي انتخابي باکتری Bt در برابر قارچ بيمارگر گياهي *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* مورد بررسي قرار گرفت. بررسي فعاليت ضد قارچي سويه هاي باکتری Bt به دو صورت؛ ۱. با استفاده از پلاگ هاي از اسپور و کريستال و ۲. با استفاده از پيش توکسين هاي سويه هاي باکتری Bt انجام گرديد. نتايج نشان داد که هفت سويه ي مورد بررسي از باکتری Bt در روش کشت دوتايي، فعاليت ضد قارچي از خود نشان ندادند. به اين ترتيب که شعاع رشد قارچ در مقابل هفت سويه ي باکتری Bt با شاهد منفي و سويه استاندارد مقايسه گرديد. در مورد شاهد منفي، هيچ پلاگ باکتريايي در نظر گرفته نشد تا شعاع رشد حداکثري قارچ *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* به دست آيد و با شعاع رشد قارچ در مواجهه با سويه هاي باکتری Bt مقايسه شود. نتايج حاکی از آن بود که تفاوت معنی داری بين شعاع رشد قارچ در شاهد منفي با تيمارها وجود ندارد (شکل ۶-۱). هم چنين، رشد قارچ بيمارگر در مواجهه با سويه استاندارد، HD-1، نيز مشابه سويه هاي انتخابي بود. به اين ترتيب، هفت سويه انتخابي از باکتری Bt، مانع از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* نشدند.

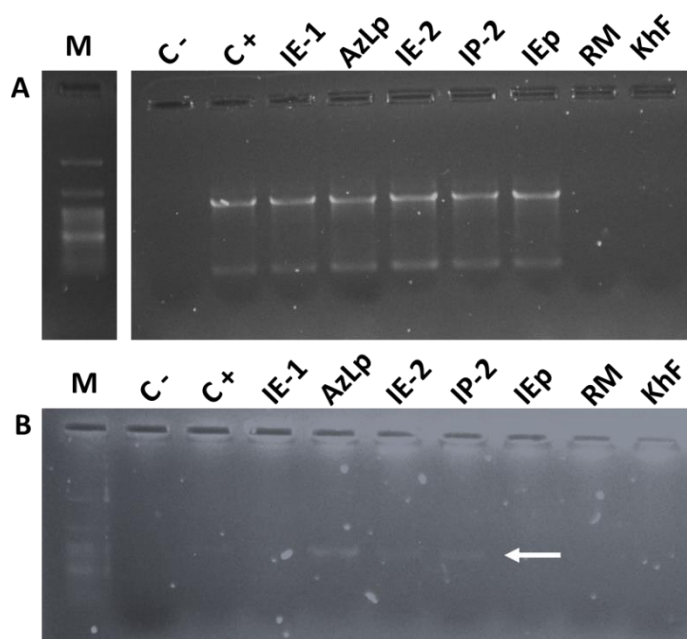


شکل ۶-۱- فعالیت ضد قارچی سویه‌های باکتری Bt. A: فعالیت ضد قارچی پلاگ باکتریایی حاوی اسپور و کریستال مورد بررسی قرار گرفت. B: فعالیت ضد قارچی پروتوکسین‌های باکتری Bt. تصاویر A1، A2، A3، B1، B2 و B3 مربوط به هفت سویه متفاوت از باکتری Bt و شاهد منفی می‌باشد.

در مطالعات پیشین، فعالیت ضد قارچی سویه‌های مختلفی از باکتری Bt، روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی متفاوت آزمون شده، و برخلاف نتایج رساله حاضر، در اکثر مطالعات انجام شده، فعالیت ضد قارچی برای سویه‌های مورد بررسی از باکتری Bt، گزارش گردیده است. برای مثال، در پژوهش Safdi و همکاران (۲۰۰۱)، پنج سویه از باکتری Bt، که پیش‌تر فعالیت حشره‌کشی آن‌ها ثابت شده بود، برای کنترل *Fusarium reseau var. sambucinum* آزمون گردید. پنج سویه‌ی انتخابی از باکتری Bt، توانایی کنترل قارچ بیمارگر گیاهی را در شرایط *in vitro* نداشتند. در حالی‌که در شرایط *in vivo* بین ۴۱ تا ۵۲ درصد بیمارگی پوسیدگی نرم را روی غده‌های سیب‌زمینی کنترل کردند. همچنین، از میان ۳۰ جدایه‌ی باکتریایی مورد بررسی در پژوهش Goma (۲۰۱۲)، سویه NM101-19 از باکتری Bt، بیشترین فعالیت کیتینازی را داشته است. این سویه از باکتری Bt، به دلیل داشتن پتانسیل برای از بین بردن دیواره‌ی سلولی قارچ‌های بیمارگر گیاهی، کاندیدی مناسب برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی انتخاب شده است. به‌علاوه، در کلنی‌هایی از قارچ *F. oxysporum subsp. lycopersici*

که تحت تأثیر دلتا-اندوتوکسین باکتری *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* بودند، نرخ رشد و اسپورزایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و تغییراتی در شکل و رنگ کلنی‌های قارچ مشهود بود. در بررسی اثر حفاظتی دلتا-اندوتوکسین در برابر قارچ *Fusarium* از میوه‌های گوجه‌فرنگی در طی انبارداری، مشخص شد که در میوه‌های دارای شیوع کم بیماری، گسترش بلایت ویروسی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Kamenek et al., 2012). در پژوهشی دیگر، فعالیت ضد قارچی ۱۳۷ سویه‌ی الجزایری از باکتری Bt در برابر پنج قارچ بیمارگر گیاهی مورد بررسی قرار گرفت (Djenane et al., 2017). قارچ‌های بیمارگر انتخابی شامل *Aspergillus niger*، *Colletotricum* sp.، *Monilia* sp.، *Thielaviopsis* sp. و *Fusarium* sp. بودند. نکته قابل توجه آن که، بر خلاف نتایج به دست آمده در این رساله که سویه‌های مورد مطالعه فعالیت ضد قارچی از خود نشان ندادند، بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش Djenane و همکاران (۲۰۱۷)، تقریباً تمامی سویه‌های انتخابی (۱۳۵ از ۱۳۷ سویه)، حداقل علیه یکی از قارچ‌های انتخابی، فعالیت ضد قارچی داشتند. بیشترین میزان فعالیت ضد قارچی، در مورد قارچ *A. niger* مشاهده شد، به طوری که ۷۷/۴ درصد از سویه‌های باکتری Bt، مانع رشد این قارچ شدند. کمترین میزان فعالیت ضد قارچی نیز در مورد قارچ *Fusarium* sp. گزارش شد.

از طرف دیگر، آنزیم کیتیناز یکی از مهم‌ترین عوامل ضد قارچی شناخته شده در سویه‌های مختلف باکتری Bt می‌باشد. سویه‌هایی از باکتری Bt که توانایی تولید آنزیم کیتیناز را دارند، فعالیت ضد قارچی زیادی در برابر *Fusarium roseum* var. *sambucinum* (عامل بیماری پوسیدگی خشک غده سیب‌زمینی)، *Fusarium oxysporum*، *Rhizoctonia* sp.، *Penicillium chrysogenum*، *Sclerotium rolfsii*، *Urocystis tritici*، *F. verticillioides* و *B. cinerea* از خود نشان داده‌اند (Salehi Jouzani et al., 2017). در نتیجه در این رساله، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی وجود ژن‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز در سویه‌های انتخابی از باکتری Bt، مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر ژن اندوکیتیناز در سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2 مثبت بود و ژن اگزوکیتیناز در پنج سویه‌ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEp یافت شد (شکل ۶-۲).

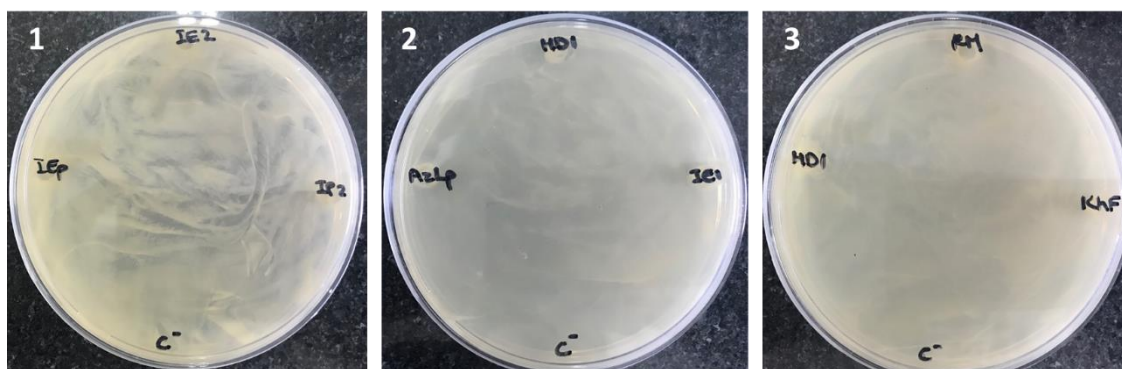


شکل ۶-۲- تکثیر ژن‌های اندوکیتیناز و آگزوکیتیناز در هفت سویه مورد بررسی از باکتری Bt. تصویر A: مربوط به تکثیر بخشی از ژن آگزوکیتیناز با اندازه‌ی ۱۰۸۳ جفت‌باز، و تصویر B: نشان‌دهنده‌ی تکثیر قطعه‌ای از ژن اندوکیتیناز با اندازه‌ی ۱۹۹۷ جفت‌باز، می‌باشد. حروف M، معرف مارکر مولکولی، C-، شاهد منفی و C+، شاهد مثبت، و سایر لاین‌ها مربوط به سویه‌های باکتری Bt، می‌باشد.

در پژوهش Djenane و همکاران (۲۰۱۷)، وجود ژن‌های آگزوکیتیناز و اندوکیتیناز در ۱۳۷ سویه باکتری Bt، مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه آنکه، وجود ژن اندوکیتیناز در ۸۲ سویه و ژن آگزوکیتیناز در ۶۶ سویه از باکتری Bt، تأیید شد. وجود هر دو ژن در ۴۳/۸ درصد از سویه‌های مورد بررسی مشخص شد. در پژوهش ما ارتباطی بین وجود ژن‌های کیتیناز و دامنه‌ی فعالیت قارچ‌کشی یافت نگردید. زیرا، هیچ یک از هفت سویه‌ی مورد بررسی فعالیت قارچ‌کشی علیه قارچ بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* نداشتند. در مطالعه‌ی فعالیت قارچ‌کشی سویه‌های الجزایری باکتری Bt (Djenane et al., 2017)، هم‌بستگی مثبت بین وجود ژن‌های کیتیناز و دامنه‌ی فعالیت قارچ‌کشی سویه‌های مورد بررسی به دست آمد. با این وجود، سویه‌هایی از باکتری گزارش شدند که، با وجود عدم تکثیر ژن‌های کیتیناز در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، دامنه‌ی فعالیت قارچ‌کشی وسیعی داشتند.

۶-۳-۲- فعالیت ضد باکتریایی سویه های Bt

فعالیت ضد باکتریایی سویه های انتخابی از باکتری Bt، علیه باکتری بیمارگر گیاهی *Erwinia* sp. مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، هیچ هاله ای بازدارنده ای اطراف سویه های باکتری Bt، مشاهده نشد و باکتری *Erwinia* به طور کامل در سطح محیط غذایی آگار رشد کرد (شکل ۶-۳). در مورد سویه ای استاندارد، HD-1، نیز وضعیتی مشابه، مشاهده گردید. به این مفهوم که سویه های انتخابی، فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری *Erwinia* sp. ندارند.



شکل ۶-۳- فعالیت ضد باکتریایی سویه های باکتری Bt. تصاویر ۱، ۲ و ۳ مربوط به هفت سویه متفاوت از باکتری Bt و شاهد منفی می باشد.

نتایج پژوهش های پیشین در مورد فعالیت ضد باکتریایی سویه های مختلف باکتری Bt، نشان می دهد که، باکتری Bt توانایی ایجاد اختلال در سیگنال های سیستم سنجش حدنصاب حساسیت باکتری گرم منفی *E. carotovora* را دارد و این اختلال باعث کاهش شدید بیمارگری این باکتری و کنترل بیماری پوسیدگی نرم سیب زمینی می شود (Dong et al., 2004; Zhang et al., 2007). فعالیت ضد باکتریایی سویه های الجزایری باکتری Bt، در برابر چهار باکتری بیمارگر؛ شامل دو باکتری گرم مثبت، *Staphylococcus aureus* تیپ وحشی (SM) و سویه ای مقاوم به متیسیلین^۱ (RM)، و دو باکتری گرم منفی *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت (Djenane et al., 2017). از میان ۱۳۷ سویه ای باکتری Bt، ۴۱ سویه، در برابر حداقل

^۱ Methicillin

یکی از باکتری‌های بیمارگر انتخابی، فعال بودند. نتایج به دست آمده به این ترتیب بود که، فعالیت ضد باکتریایی در ۳۰ سویه از باکتری Bt برای باکتری *S. aureus* SM، ۲۷ سویه برای *S. aureus* RM، ۲۰ سویه برای *E. coli* و ۱۰ سویه برای *P. aeruginosa* ثبت گردیده است.

دلیل عدم مشاهده‌ی فعالیت ضد میکروبی (ضد قارچی و ضد باکتریایی)، در سویه‌های مورد بررسی در این رساله، می‌تواند به منشاء جداسازی این سویه‌ها ارتباط داشته باشد. زیرا، جدایه‌هایی که از خاک، گرد و غبار، محصولات انباری و شاخ و برگ گیاهان جدا می‌شوند، در ارتباط بیشتری با جوامع میکروبی موجود در زیستگاه خود هستند در نتیجه، پتانسیل فعالیت ضد میکروبی بیشتری دارند. اما پنج سویه‌ی IE-1، AzLp، IE-2، IP-2 و IEp مورد استفاده در این رساله از حشرات آلوده و مرده، و تنها دو سویه‌ی RM و KhF از خاک جداسازی شده بودند.

از دیدگاه گیاه‌پزشکی، مجموع گیاه، حشره‌ی آفت و عامل بیماری‌زای گیاهی، به‌صورت یک مجموعه‌ی واحد در نظر گرفته می‌شود. به این مفهوم که در توصیه یک آفت‌کش زیستی برای کنترل آفات و یا بیماری‌های گیاهی، باید اثرات ناشی از اعمال آن آفت‌کش زیستی، روی گیاه میزبان هم در نظر گرفته شود. بنابراین، پرسشی که مطرح می‌شود این است که آیا برهم‌کنشی بین سویه‌های با پتانسیل حشره‌کشی از باکتری Bt و گیاه میزبان وجود دارد؟ هم‌چنین آیا استفاده از آفت‌کش زیستی بر پایه‌ی Bt باعث بروز تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه میزبان می‌شود؟ در فصل هفتم از این رساله، پاسخ مناسبی برای این پرسش‌ها آورده شده است.

فصل، هفتم

بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه

گوجه‌فرنگی در پاسخ به باکتری Bt

فصل هفتم: بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه گوجه‌فرنگی در پاسخ به باکتری Bt

۷-۱- مقدمه

نتایج پژوهش‌های پیشین به نقش باکتری Bt، در تحریک رشد گیاه از طریق تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها و یا از طریق اثرگذاری روی تعادل اتیلن گیاه، افزایش مواد غذایی معدنی و تحریک گره‌زایی در حبوبات، اشاره می‌کند. هم‌چنین، پژوهش‌هایی روی باکتری Bt، در ارتباط با حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های غیر زنده، فعالیت ضد میکروبی علیه قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی، تولید سیدروفور، تولید کیتیناز و القای مقاومت سیستمیکی در گیاه، صورت گرفته است (Raddadi et al., 2008; Goes et al., 2012).

از سوی دیگر، در ارتباط با برهم‌کنش گیاه و باکتری Bt، شواهد آزمایشی نشان می‌دهد که این باکتری توانایی انتقال و جابه‌جایی عمودی در گیاه، کلونیزه کردن و حضور به صورت فرم رویشی فعال (از لحاظ متابولیسمی) در داخل گیاه را دارد (Bizzarri and Bishop 2007, 2008; Maduell et al., 2008; Parca et al., 2012; Vidal-Quist et al., 2013; García-Suárez et al., 2017).

گونه‌هایی از باکتری جنس *Bacillus* با خاصیت اندوفیت شدن، مزایای متعددی برای گیاه دارند، از آن جمله می‌توان به: حفاظت در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی، حشرات و نماتدها، تحریک مقاومت و تحریک رشد گیاه، بدون اینکه به محیط زیست آسیبی وارد شود، اشاره کرد. گونه‌های: *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* و *B. licheniformis* جزء پرکاربردترین گونه‌های جنس *Bacillus* در کشاورزی می‌باشند (Lopes et al., 2018).

مهم‌ترین نقش باکتری‌های اشاره شده، حفاظت از گیاه در برابر حمله‌ی بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. زیرا در طی حمله‌ی عوامل بیماری‌زای گیاهی، انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر^۱ (ROS)، مانند: آنیون‌های سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیروکسیل (OH^{\bullet}) می‌شود. این اکسیژن‌های واکنش‌پذیر،

^۱ Reactive Oxygen Species (ROS)

توسط آنزیم‌های سیتوپلاسمی، آنزیم‌های متصل شده به غشاء و یا آنزیم‌های خارج سلولی، که در واکنش‌های کاهش نقش دارند، تولید می‌شوند (Greene et al., 2002). برای جلوگیری از آسیب‌های احتمالی این اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، سلول‌های گیاهی چندین سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی و غیر آنزیمی دارند که اکسیژن‌های واکنش‌پذیر را غیر سمی می‌کند. تحت شرایط تنش، تشکیل و از بین رفتن اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، به تعادل می‌رسد. با این وجود، برخی از تنش‌های زنده و غیر زنده مانند حمله‌ی بیمارگرها، ازدیاد انرژی نوری، خشکی و دمای پایین، تولید انواع اکسیژن واکنش‌پذیر را افزایش می‌دهد که این افزایش منجر به آسیب سلول و غیر فعال شدن آنزیم‌ها می‌شود. در نهایت، اگر غلظت اکسیژن‌های واکنش‌پذیر به شدت افزایش یابد، به طوری که سیستم از بین برنده توانایی غیر سمی کردن آن‌ها را نداشته باشد، مرگ سلول رخ می‌دهد. در پی حمله‌ی بیمارگرها به گیاهان، چندین سیستم آنزیمی یافت شده‌اند که، در متابولیسم اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، شرکت می‌کنند. در این بین، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز^۱ (SOD; EC 1.15.1.1)، کاتالاز^۲ (CAT; EC 1.11.1.6)، گایاکول پراکسیداز^۳ (GPX; EC 1.11.1.7) و آسکوربات پراکسیداز^۴ (APX; EC 1.11.1.11)، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این آنزیم‌ها، مانع از بین رفتن انسجام سلول‌های گیاهی به وسیله‌ی اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، در طی برهم‌کنش‌های گیاه-بیمارگر می‌شوند (Bolwell et al., 2002; Mittler 2002). تولید بیش از حد اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در طی واکنش‌های اکسیداتیو، قسمتی از واکنش سلول‌های گیاهی به بیمارگرها می‌باشد. ارتباط بین تشکیل اکسیژن‌های واکنش‌پذیر و افزایش فعالیت آنزیم‌هایی که در متابولیسم آن‌ها نقش دارند، تحت تأثیر واکنش‌های دفاعی گیاه میزبان نسبت به حمله‌ی بیمارگرها، در بسیاری از گیاهان (جدول ۷-۱) مورد بررسی قرار گرفته است (Wojtaszek 1997).

¹ Superoxide dismutase

² Catalase

³ Guaiacol peroxidase

⁴ Ascorbate peroxidase

جدول ۷-۱ - واكنش گياهان متفاوت به حمله ي بيمار گرها

Plant	Pathogen	Observation	Reference
Plant-fungus interactions			
Dark red kidney bean	<i>Colletotrichum lindemuthianu</i> galactoglucomannan	Accumulation of free radicals and cell death	Anderson et al., 1991
Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	Increased peroxidase activity	Vera-Estrella et al., 1992
Carrot protoplasts	<i>Pythium aphanidermatum</i> secreted compounds	None	Bach et al., 1993
Cotton	<i>Verticillium dahliae</i>	H ₂ O ₂ production, heterogeneity in oxidative processes	Davis et al., 1993
Parsley	<i>P. megasperma</i> pure glycoprotein	H ₂ O ₂ production	Nurnberger et al., 1994
Tobacco	<i>P. parasitica</i> Crude cell wall	Salicylic acid enhances the oxidative burst.	Bottin et al., 1994
Potato tuber discs	<i>Phytophthora</i> zoospores or hyphal wall components	•O ₂ ⁻ production	Foyer et al., 1994
French bean	<i>C. lindemuthianum</i> crude cell wall, chitin or chitosan oligomers	Alkalization of apoplast	Bolwell et al., 1995
Rice	N-Acetylchitoplignosaccharides	Accumulation of free radicals	Kuchitsu et al., 1995
Rose	<i>Phytophthora</i> sp. Crude cell wall	production H ₂ O ₂	Auh and Murphy 1995
Tomato cotyledons	<i>C. fulvum</i>	•O ₂ ⁻ production	May et al., 1996

ادامه‌ی جدول ۷-۱- واکنش گیاهان متفاوت به حمله‌ی بیمارگرها

Plant	Pathogen	Observation	Reference
Plant-bacterium interactions			
White clover	<i>Pseudomonas corrugate</i> cells	H ₂ O ₂ production	Devlin and Gustine 1992
Tobacco	<i>Erwinia amylovora</i> cells	Not identified	Baker et al., 1993
Soybean	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	H ₂ O ₂ production and cell death	Levine et al., 1994
Tobacco	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Normal phase of ROS production, but no cell death observed.	Glazener et al., 1996
Tomato and Tobacco	<i>Ralstonia solanacearum</i>	H ₂ O ₂ and free radicals production	Flores-Cruz and Allen 2009
Tomato	<i>R. solanacearum</i>	H ₂ O ₂ production	Mandal et al., 2011
Plant-virus interactions			
Tobacco leaf discs	Tobacco mosaic virus	•O ₂ ⁻ observation	Doke and Ohashi 1988

نتایج پاشش سویه‌ی *B. subtilis* AUBS1 روی گیاه برنج، از طریق افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های

PAL و CAT، بیماری سوختگی غلاف برنج را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Jayaraj et al., 2004).

اثر کمی باکتری *B. subtilis* روی فعالیت آنزیم‌های سیستم ایمنی گیاه خیار برای کنترل بیماری

پژمردگی فوزاریومی، توسط Chen و همکاران (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم

پراکسیداز در گیاه خیار، زمانی بوده است که گیاه با باکتری *B. subtilis* تلقیح شده بود.

اثر تلقیح گیاه ذرت با گونه‌های مختلفی از باکتری *Bacillus* شامل؛ *B. licheniformis*، *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens thuringiensis* روی رشد، فشار اسمزی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ذرت، مورد بررسی قرار گرفت (Vardhalajula et al., 2011). نتایج حاکی از آن بود که، تحت اثر گونه‌های *Bacillus* spp. توده‌ی زیستی گیاه، محتوای نسبی آب و پتانسیل آب برگ، افزایش یافت. تلقیح گیاه ذرت با باکتری‌های مورد استفاده از جنس *Bacillus*، منجر به افزایش پرولین، کربوهیدرات و اسیدآمین‌های آزاد و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله؛ آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز شد. نتیجه آنکه گیاه ذرت به تلقیح شدن با *Bacillus* spp. واکنش فیزیولوژیکی نشان می‌دهد، که می‌تواند اثرات منفی حاصل از تنش خشکی را کاهش دهد.

در پژوهش Armada و همکاران (۲۰۱۵)، چندین پارامتر فیزیولوژیکی در گیاه ذرت تحت تنش خشکی، تیمار شده و تیمار نشده با Bt، اندازه‌گیری شد. پارامترهای مورد بررسی شامل؛ رشد گیاه، کارایی فتوسنتز، محتوای مواد غذایی، تخریب اکسیداتیو لیپیدها، تجمع پرولین و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بود. تحت تنش خشکی، تلقیح گیاه ذرت با باکتری Bt، تجمع مواد غذایی در گیاه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. به‌طور کلی، تلقیح گیاه ذرت تحت تنش خشکی، با باکتری Bt، باعث افزایش رشد، افزایش مواد غذایی و بهبود شرایط فیزیولوژیکی گیاه گردید. اما، تفاوت معنی‌داری در غلظت پرولین، در گیاه عادی تیمار شده و تیمار نشده با Bt، وجود نداشته است.

زمانی که گیاه اسطوخودوس فرانسوی *Lavandula dentata*، تحت تنش خشکی با میکروارگانیزم‌های متفاوتی از جمله؛ پنج گونه از قارچ‌های میکوریزا، و باکتری Bt تیمار می‌شود، توانایی مبارزه با واکنش‌های مخرب اکسیداتیو را پیدا می‌کند. به‌ویژه هنگام تلقیح با باکتری Bt با مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدانی مؤثرتری با تنش خشکی مبارزه می‌کند. به عبارتی، دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با Bt، از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز، منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (Armada et al., 2016).

بنابراین عدم تأثیر سوء مخلوط اسپور و کریستال باکتری Bt روی گیاه گوجه‌فرنگی، به‌عنوان فرضیه‌ی این فصل از رساله اتخاذ گردید.

۷-۲- مواد و روش ها

۷-۲-۱- کشت گیاه گوجه فرنگی

بذرهای گیاه گوجه فرنگی رقم سلطان، در خاک استریل شده‌ی مخلوطی از کوکوپیت و پرلیت، کشت و نشاءهای گوجه فرنگی بعد از دو هفته، به گلدان‌های پلاستیکی انتقال داده شدند. تعداد ۹۶ گلدان گوجه فرنگی، برای انجام این بخش از آزمایش‌های رساله تهیه گردید. گلدان‌های در گلخانه‌ی تحقیقاتی بخش حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، تحت شرایط قابل کنترل نگهداری شدند. گیاه‌های گوجه فرنگی پنج هفته‌ای، با سوسپانسیون Bt تلقیح شدند.

۷-۲-۲- تلقیح گیاه گوجه فرنگی و خاک با سوسپانسیون باکتری Bt

سویه‌ی زهرآگین AzLp از باکتری Bt، روی محیط غذایی آگار کشت داده و به مدت چهار روز در دمای ۲۹ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، کلنی‌های باکتریایی رشد کرده، زیر هود، تحت شرایط استریل، با یک لوپ استریل از سطح محیط کشت جدا و با آب مقطر استریل مخلوط گردیدند. مخلوط به دست آمده به خوبی ورکس شد تا سوسپانسیون یکنواختی از مخلوط اسپور و کریستال باکتری Bt حاصل شود. سوسپانسیون به کمک لام هموسیتمتر یا لام گلبول‌شمار تعیین غلظت شد و غلظت 10^8 اسپور بر میلی‌لیتر آماده گشت. تلقیح گیاه گوجه فرنگی با سوسپانسیون تهیه شده از باکتری Bt، به دو صورت پاشش روی اندام‌های هوایی و تلقیح خاک اطراف ریشه انجام گرفت. برای تلقیح اندام‌های هوایی، ابتدا، خاک گلدان با چند لایه از سلفون، به طور کامل پوشانده شد تا مانع از نفوذ سوسپانسیون پاشیده شده روی اندام‌های هوایی به خاک شود (شکل ۷-۱). سپس، سوسپانسیون باکتری Bt در با یک افشانه روی گیاه به طور کامل پاشش شد. پاشش روی اندام‌های هوایی تا جایی ادامه پیدا کرد که، رواناب^۱ مشاهده گشت. در مورد تیمار خاک، پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از سویه‌ی AzLp، به خاک اطراف ریشه تلقیح گردید. در مورد شاهد‌ها نیز، همان حجم مصرفی از سوسپانسیون،

^۱ Runoff

آب مقطر استریل به اندام هوایی پاشیده شد و یا به خاک اطراف ریشه افزوده گشت. در نتیجه، در این آزمایش، دو تیمار خاک و اندام های هوایی و نیز دو شاهد خاک و اندام های هوایی، در سه تکرار در نظر گرفته شد.



شکل ۷-۱- گلدان های گیاه گوجه فرنگی که سطح خاک با سلفون پوشانده شده است.

۷-۲-۳- نمونه برداری

هشت زمان نمونه برداری از اندام های هوایی گیاه گوجه فرنگی در نظر گرفته شد. به این ترتیب که، دو ساعت پس از پاشش سوسپانسیون باکتری Bt، روی اندام های هوایی گیاه (بعد از خشک شدن سوسپانسیون)، به عنوان زمان صفر اتخاذ گردید، و سپس در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ پس از تلقیح گیاه و خاک، نمونه برداری انجام گرفت. معیار انتخاب زمان های نمونه برداری، مدت زمان مورد نیاز برای انجام آزمایش های زیست سنجی با توکسین و یا مخلوط اسپور و کریستال باکتری Bt بود. در هر یک از زمان های انتخابی، دو تیمار و دو تکرار در نظر گرفته شده بود که هر کدام سه تکرار داشتند. در نتیجه، هنگام نمونه برداری در هر یک از هشت زمان انتخابی، تعداد ۱۲ عدد گلدان، به آزمایشگاه منتقل می گردید. در هر یک از بازه های نمونه برداری، برگ های گیاه گوجه فرنگی بریده و به هاون چینی منتقل شدند. به برگ های بریده شده، نیتروژن مایع اضافه گردید و به خوبی با هاون کوبیده شدند تا پودر سبکی از برگ ها حاصل شود. سپس، برگ های پودر شده از هر تیمار یا هر شاهد، به

لوله‌ی فالکون برچسب‌داری (ذکر نام تیمار و یا شاهد و درج تاریخ) منتقل و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۴-۲-۷- بررسی پارامترهای آنزیمی و غیر آنزیمی

پارامترهای آنزیمی مورد بررسی شامل مطالعه‌ی فعالیت آنزیم‌های؛ کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پلی فنول اکسیداز (PPO) و فنیل آلانین آمونیا-لیاز (PAL) بود. برای پارامترهای غیر آنزیمی؛ اندازه‌گیری پروتئین، محتوای فنولی کل، کربوهیدرات محلول و پرولین در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پراکسید هیدروژن با استفاده از فرمول زیر صورت گرفت:

$$\text{Enzyme activity} = (\Delta\text{OD} \times L \times V_t \times df) / (\varepsilon \times I \times T \times V_s)$$

که در این فرمول، ΔOD ؛ تفاوت بین جذب نوری در اولین و آخرین زمان قرائت، L ؛ ضریب H_2O_2 در معادله، V_t ؛ حجم نهایی واکنش، df ؛ عامل رقیق‌کننده، ε ؛ ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی، I ؛ مسافت طی شده توسط نور از محلول، T ؛ زمان و V_s ؛ حجم نمونه، می‌باشد.

فعالیت سایر آنزیم‌های مورد نظر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

(زمان $\times \text{min}$ \times حجم آنزیم استخراج شده ml) / (غلظت محصول تولید شده $\mu\text{mol/ml}$ \times حجم نهایی واکنش ml) = فعالیت آنزیم

واحد فعالیت آنزیم‌های محاسبه شده از طریق این فرمول، $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ، می‌باشد.

۴-۲-۷-۱- فعالیت آنزیم کاتالاز

مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ گیاه گوجه‌فرنگی، توزین و در یک میلی‌لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۶/۸ هموژن شدند. هموژن به دست آمده، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس، با دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. روشن‌شده به دست آمده، به‌عنوان عصاره‌ی آنزیمی برای آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز استفاده شد.

فعالیت آنزیم CAT، از طریق اندازه‌گیری نرخ از بین رفتن یا ناپدید شدن پراکسید هیدروژن، H_2O_2 ، در طول موج ۲۴۰ نانومتر، مشخص گردید (Aebi 1984). فعالیت آنزیم کاتالاز به مدت سه دقیقه، با قرائت میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در بازه‌های ۳۰ ثانیه‌ای، اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش، مطابق جدول ۷-۲ تهیه و در مورد شاهد، به جای عصاره‌ی آنزیمی، از ده میکرولیتر بافر فسفات استفاده گشت.

جدول ۷-۲- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم CAT

Component	Concentration	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50 mM	300
H_2O_2	0.05%	30
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	360

جدول ۷-۴-۲- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم GPX، بر اساس پروتکل Plewa و همکاران (۱۹۹۱)، اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش مطابق جدول ۷-۳، تهیه گشت. با افزودن عصاره‌ی آنزیمی، واکنش آغاز و میزان افزایش جذب نوری، در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه، هر ۳۰ ثانیه یک بار قرائت گردید. فعالیت آنزیمی از طریق مقدار تتراگایاکول تشکیل شده با ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی (ϵ) $26/6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ، کمی و اندازه‌گیری شد. قابل ذکر است که برای تولید یک مول تتراگایاکول، نیاز به چهار مول H_2O_2 می‌باشد. در مورد شاهد، به جای عصاره‌ی آنزیمی، از ۳۰ میکرولیتر بافر فسفات استفاده شد.

جدول ۷-۳- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم GPX

Component	Concentration	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50 mM	240
H_2O_2	30%	10
Guaiacol solution	10 mM	10
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	290

۷-۲-۴-۳- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

میزان فعالیت آنزیم APX، از طریق اکسایش آسکوربیک اسید، در طول موج ۲۹۰ نانومتر، با ضریب جذب مولی $2/8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ برای آسکوربات، اندازه‌گیری شد (Ranieri et al., 2003). مخلوط واکنش مطابق جدول ۷-۴ تهیه گردید و فعالیت آنزیم APX، در طی سه دقیقه، هر ۳۰ ثانیه یک بار قرائت و ثبت شد. در مورد شاهد، به جای عصاره‌ی آنزیمی، از ۳۰ میکرولیتر بافر فسفات استفاده شد.

جدول ۷-۴- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم APX

Component	Concentration	Volume (μl)
Phosphate buffer	50 mM	190
H ₂ O ₂	1%	10
Ascorbic acid	0.5 mM	30
EDTA	0.1 mM	30
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	290

۷-۲-۴-۴- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، از طریق توانایی این آنزیم در مهار احیاء فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم کلراید^۱ (NBT)، اندازه‌گیری می‌شود (Beauchamp and Fridovich 1971). در این آزمون، در طی وقایع فتوشیمیایی، ابتدا، رادیکال آزاد اکسیژن، $\text{O}_2^{\bullet -}$ تولید و سپس، از NBT برای شناسایی این رادیکال، استفاده می‌شود. در واقع، NBT شناساگر رادیکال‌های آزاد $\text{O}_2^{\bullet -}$ می‌باشد. به‌طور کلی، آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت SOD، از دو جزء اصلی تشکیل شده است؛ یک جزئی که تولید کننده‌ی رادیکال‌های سوپراکسید است و جزء دوم شناساگر رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده می‌باشد. در این رساله، از روش فتوشیمیایی، با استفاده از ریوفلاوین، رادیکال‌های سوپراکسید تولید شد و از روش نورسنجی، رادیکال‌های تولید شده شناسایی گردید. یک واحد فعالیت آنزیم SOD، به‌عنوان مقداری از آنزیم تعریف می‌شود که، باعث مهار ۵۰ درصدی احیای NBT شود.

¹ Nitroblue tetrazolium chloride

مخلوط واکنش، مطابق جدول ۷-۵ تهیه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه زیر لامپ فلوئورسنت نگه داشته شد. برای این آزمایش، دو شاهد در نظر گرفته شد؛ شاهد تاریکی و شاهد روشنائی. تمامی میکروتیوب‌های شاهد تاریکی، با فویل آلومینیومی پوشانده و از معرض تابش نور دور نگه داشته شدند. در مورد شاهد، به جای عصاره‌ی آنزیمی، از ده میکرولیتر از بافر فسفات استفاده گردید. احیاء NBT در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جدول ۷-۵- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم SOD

Component	Concentration	Volume (μl)
Phosphate buffer	50 mM	2350
EDTA	13 mM	200
Methionine	50 mM	300
NBT	1 mM	2000
Riboflavin	0.2 mM	50
Enzyme extract		10
Total volume		4910

فعالیت مهارکنندگی آنزیم SOD، از طریق فرمول $p = [(V - V_0) / V_0] \times 100$ محاسبه گردید. در این فرمول، p : درصد مهارکنندگی یا فعالیت آنزیم SOD، V : نرخ واکنش در حضور آنزیم و V_0 : نرخ واکنش در عدم حضور آنزیم، می‌باشد.

۷-۲-۴-۵- فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم PPO، مخلوط واکنش بر اساس روش Kar و Mishra (۱۹۷۶)، مطابق با جدول ؟؟؟، تهیه گردید. میزان جذب محصول واکنش، پورپورگالین^۱، حاصل از واکنش PPO موجود در بافت گیاه گوجه‌فرنگی با پیروکتکول^۲ به‌عنوان سوبسترا، در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب در طی سه

¹ Purpurogallin

² Pyrocatechol

دقیقه، هر ۳۰ ثانیه یک بار قرائت و ثبت گردید. در مورد شاهد، به جای عصاره‌ی آنزیمی، از ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات استفاده شد.

جدول ۷-۶- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم PPO

Component	Concentration (mM)	Volume (μ l)
Phosphate buffer	50	200
Pyrocatechol	50	50
Enzyme extract	-	50
Total volume	-	300

۷-۲-۴-۶- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL موجود در بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی، ۰/۵ گرم از برگ‌های پودر شده در یک میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۸، هموژن گردید. هموژن تهیه شده، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس، با دور $13000 \times g$ سانتریفیوژ شد. روتشین به دست آمده، به‌عنوان عصاره‌ی آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم PAL، بر اساس نرخ تولید اسید سینامیک، تعیین می‌گردد (Wang et al., 2006). مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL، مطابق جدول ۷-۷، برای تیمار و شاهد آماده گردید. با این تفاوت که، در مورد شاهد، به‌جای عصاره‌ی آنزیمی از ۳۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl استفاده شد.

جدول ۷-۷- مقادیر و غلظت مواد مصرف شده برای سنجش فعالیت آنزیم PAL

Component	Concentration (mM)	Volume (μ l)
Tris-HCl buffer	50	100
L-phenylalanine	30	60
Enzyme extract	-	30
Total volume	-	190

مخلوط آماده شده براي تيمار و شاهد، به مدت يك ساعت در دماي ۳۷ درجه سلسيوس نگه داشته شد. با اضافه كردن ۵۰ ميكروليتر از HCl شش مولار به هر نمونه، واكنش آنزيمي متوقف گرديد. محصول واكنش با افزودن يك ميلي ليتر اتيل استات به هر نمونه، و سپس با تبخير با گاز نيتروژن، استخراج شد. به باقي مانده ي واكنش، ۳۰۰ ميكروليتر NaOH ۰/۰۵ مولار اضافه شد. در نهايت، غلظت سيناميك اسيد، با اندازه گيري جذب نوري در طول موج ۲۹۰ نانومتر، تخمين زده شد.

۲-۴-۷- محتوای فنولی کل

محتوای فنولی کل موجود در برگ های گیاه گوجه فرنگی، از طريق برهم کنش تركيبات فنولی با يك معرف، به نام فولین-سيوكلتو^۱ (F-C)، با روش رنگ سنجی اندازه گيري گرديد. روش F-C، بر مبنای انتقال الكترون در يك محيط قليایی، از تركيبات فنولی به تركيبات فسفوموليديك/فسفوتونگستيك اسيد^۲ می باشد كه منجر به تشكيل تركيبات آبی رنگ می شود كه در طول موج ۷۶۰ نانومتر با اسپكتروفوتومتر، قابل اندازه گيري است. برای اندازه گيري محتوای فنولی کل، از پروتكل Ainsworth و Gillespie (۲۰۰۷) استفاده گرديد. منحنی استاندارد، با استفاده از گالیک اسيد، معادل محتوای فنولی، ترسيم گشت. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های مختلف گالیک اسيد، از ۰/۰۳ تا ۲/۵ ميلي مولار، بهره جسته شد. محلول گالیک اسيد در متانول ۹۵ درصد (حجمی/حجمی) تهيه گرديد. روش انجام كار به اين ترتيب بود كه، ۵۰ ميلي گرم از بافت گیاهی در يك ميلي ليتر از متانول ۹۵ درصد، هموزن شدند. هموزن تهيه شده، به مدت ۴۸ ساعت، در تاریکی و در دمای محیط نگه داشته شد. سپس، نمونه ها به مدت ۱۵ دقيقه، در دمای چهار درجه سلسيوس با دور $13000 \times g$ سانترفيوژ گرديدند. در ادامه، ۱۰۰ ميكروليتر از رونشين هر نمونه، استاندارد و يا متانول ۹۵ درصد، به ميكروتيوب های دو ميلي ليتری به ترتيب، تيمار، استاندارد و شاهد اضافه گشت. سپس، ۲۰۰ ميكروليتر از معرف F-C ده درصد، به ميكروتيوب ها افزوده گرديد و تيوب ها به خوبی ورتكس شدند. در مرحله ي بعد، ۸۰۰ ميكروليتر سدیم كربنات (Na₂CO₃) ۷۰۰ ميلي مولار، به ميكروتيوب ها اضافه گشت. نمونه ها به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگه داشته شدند. برای قرائت

¹ Foiln-Ciocalteu

² Phosphomolybdic/phosphotungstic acid

جذب نوری، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه، به چاهک‌های پلیت ۹۶-خانه‌ای ریخته و جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت گردید.

۷-۲-۴-۸- محتوای پرولین

محتوای پرولین گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده و نشده به روش Carillo و Gibon (۲۰۱۱) اندازه‌گیری شد. پرولین، اسید آمینه‌ای بسیار محلول است که به راحتی از بافت گیاهی حرارت دیده، استخراج می‌شود. برای اندازه‌گیری پرولین، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی در مخلوطی با نسبت حجمی:حجمی ۶۰:۴۰، آب:اتانول، هموزن و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس نگه داشته شد. سپس، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس، با دور $14000 \times g$ سانتریفیوژ گردیدند. برای رسم منحنی استاندارد، محلول‌های پرولین از غلظت ۰/۱۵۶ تا یک میلی‌مولار، در همان محیط ۶۰:۴۰، آب:اتانول تهیه گشت. برای تهیه‌ی مخلوط واکنش، معرف نینهدرین^۱ یک درصد (وزنی/حجمی) به استیک اسید ۶۰ درصد (حجمی/حجمی) و اتانول ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) اضافه شد. سپس، به هر یک از میکروتیوب‌های آماده شده برای آزمایش، ۳۰۰ میکرولیتر تر مخلوط واکنش افزوده گشت. پس از آن، ۱۵۰ میکرولیتر از استاندارد، مخلوط اتانول:آب و یا عصاره‌ی آنزیمی، به ترتیب به میکروتیوب‌های استاندارد، شاهد و تیمار اضافه گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگه داشته و بعد از آن، به مدت یک دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس، با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از روشن‌ترین به دست آمده، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر، قرائت و ثبت گردید.

۷-۲-۴-۹- محتوای پروتئینی

محتوای پروتئینی نمونه‌ها، به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین گشت. بدین منظور، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی، در یک میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۸، هموزن گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور $13000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. پروتئین موجود در روشن‌ترین به دست آمده،

^۱ Ninhydrin

اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد، از پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA)، به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید. غلظت‌های ۲ تا ۰/۰۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از BSA، تهیه گشت. از معرف بردفورد، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و با ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌ی گیاهی مخلوط گردید. جذب نوری در دو طول موج ۵۹۵ و ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

۷-۲-۴-۱۰- کربوهیدرات محلول

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی در یک میلی‌لیتر از آب دیونیزه، هموژن شد. هموژن به دست آمده، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای چهار درجه سلسیوس با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گشت. تعیین غلظت کربوهیدرات در روشین به دست آمده، با استفاده از معرف آنترون^۱، و با استناد به روش Dreywood (۱۹۴۶)، انجام گرفت. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت‌های مختلف گلوکز، از یک تا ۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. معرف آنترون در سولفوریک اسید تهیه گشت، به طوری که دو گرم از آنترون با یک لیتر سولفوریک اسید ۹۶ تا ۹۸ درصد، مخلوط شد. معرف به ظرف شیشه‌ای که با فویل آلومینیوم پوشانده شده بود، منتقل گشت. سپس، به هر یک از میکروتیوب‌های آماده شده برای آزمایش، ۶۰۰ میکرولیتر معرف آنترون افزوده گشت. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر از استاندارد، آب و یا عصاره‌ی گیاهی، به ترتیب به میکروتیوب‌های استاندارد، شاهد و تیمار اضافه گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس (در یخچال)، سپس، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و پس از آن، ۲۰ دقیقه در دمای محیط، نگه داشته شدند. در نهایت، میزان جذب نور در ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط به دست آمده، در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و ثبت گردید.

۷-۳- نتایج و بحث

در این بخش از رساله تغییرات متابولیسمی و بیوشیمیایی سویه‌های ایرانی از باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی، در قالب پاشش روی شاخ و برگ گیاه و یا تلقیح خاک اطراف ریشه، مورد بررسی قرار بگیرد. به طور کلی، بر اساس نتایج به دست آمده، تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری Bt، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، گردید. از میان پارامترهای مورد بررسی نتایج مربوط به آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز،

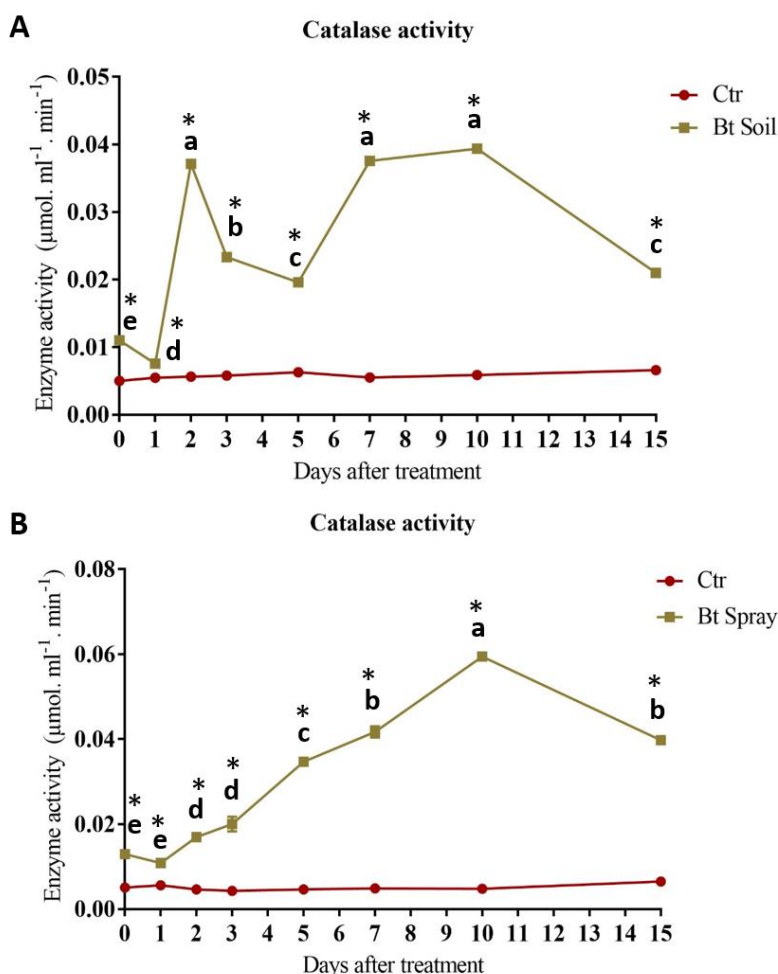
¹ Anthrone

فنیل آلانین آمونیا-لیاز و پلی فنول اکسیداز، و محتوای فنولی، پروتئینی، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول، قابل استناد می‌باشد که در ادامه به تفصیل به آن‌ها پرداخته شده است.

۱-۳-۷- فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو تیمار خاک و پاشش باکتری Bt روی اندام‌های هوایی، نسبت به شاهد‌ها، به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است ($P < 0.0001$). در نتیجه‌ی برهم‌کنش گیاه با اسپور و کریستال باکتری Bt، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز، در تیمار خاک، در روزهای ۲، ۷، و ۱۰ پس از تلقیح گیاه مشاهده گشت. به‌عبارتی، در تیمار خاک، پس از گذشت یک روز، فعالیت آنزیم کاتالاز به شدت افزایش پیدا کرده به طوری که در روز دوم به بیشینه‌ی فعالیت خود رسیده، اما، سپس تا روز پنجم، رویه‌ی نزولی در پیش گرفته است. از روز پنجم تا روز دهم، سطح فعالیت آنزیم کاتالاز، افزایش چشم‌گیری یافته و مجدد به بیشینه فعالیت خود در روزهای هفتم و دهم رسیده است. در حالی که در تیمار اندام‌های هوایی، تنها یک اوج مربوط به بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز، در روز دهم، ثبت گردید (شکل ۷-۲). بعد از روز دهم، فعالیت آنزیم کاتالاز، رو به کاهش گذاشته است. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز، در تیمار خاک، 0.39 و در تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی $0.59 \mu\text{mol.ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ می‌باشد.

آنزیم کاتالاز، یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که در سیستم ایمنی اصلی گیاه در مقابل تجمع و سمیت رادیکال‌های اکسیژن، با از بین بردن H_2O_2 ، فعالیت می‌کند (Shakir et al., 2018). در این پژوهش، فعالیت آنزیم کاتالاز، در هر دو تیمار تلقیح شده با باکتری Bt، افزایش پیدا کرده است. در مقایسه‌ی اثر Bt، با آفت‌کش‌های شیمیایی، روی واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه، می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گوجه‌فرنگی بر اثر استفاده از سم ایمیداکلوپرید، اشاره کرد (Shakir et al., 2018).

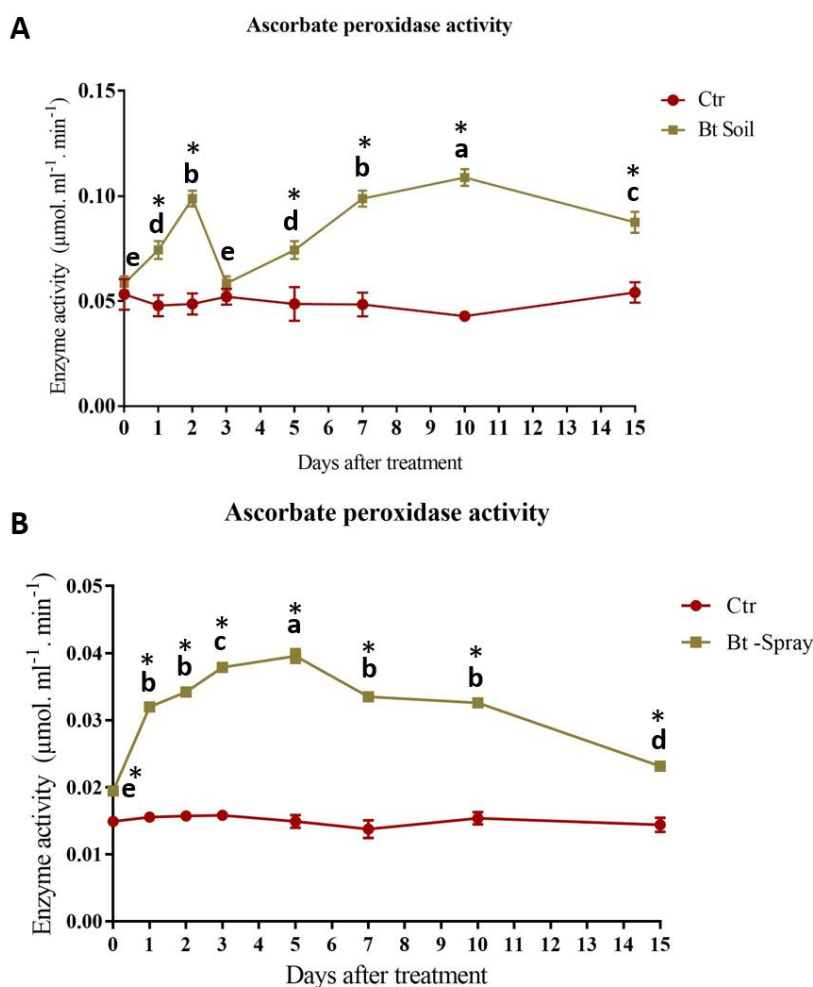


شکل ۷-۲- میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol. ml}^{-1}. \text{min}^{-1}$ در گیاه گوجه-فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی، تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی‌دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P < 0.05$)، در هر روز داده‌برداری با ستاره، مشخص شده است.

۷-۳-۲- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری Bt، سطح فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در اندام‌های هوایی گیاه گوجه‌فرنگی افزایش داده است. فعالیت آنزیم APX، به‌طور معنی‌داری، در دو تیمار خاک و پاشش روی اندام‌های هوایی، نسبت شاهد افزایش داشته است. در تیمار خاک؛ فعالیت آنزیم APX، از ساعات اولیه‌ی بعد از تلقیح گیاه،

روند افزایشی داشته و در روز دوم به اوج خود می‌رسد، سپس رویه‌ی نزولی پیش می‌گیرد. لیکن، مجدد در روز دهم، به دومین پیک فعالیت خود می‌رسد (شکل ۷-۳). به طور کلی، میزان فعالیت آنزیم APX، در طی روزهای مختلف، در تیمار تلقیح خاک، بیشتر از تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی بوده است ($P < 0.0001$).



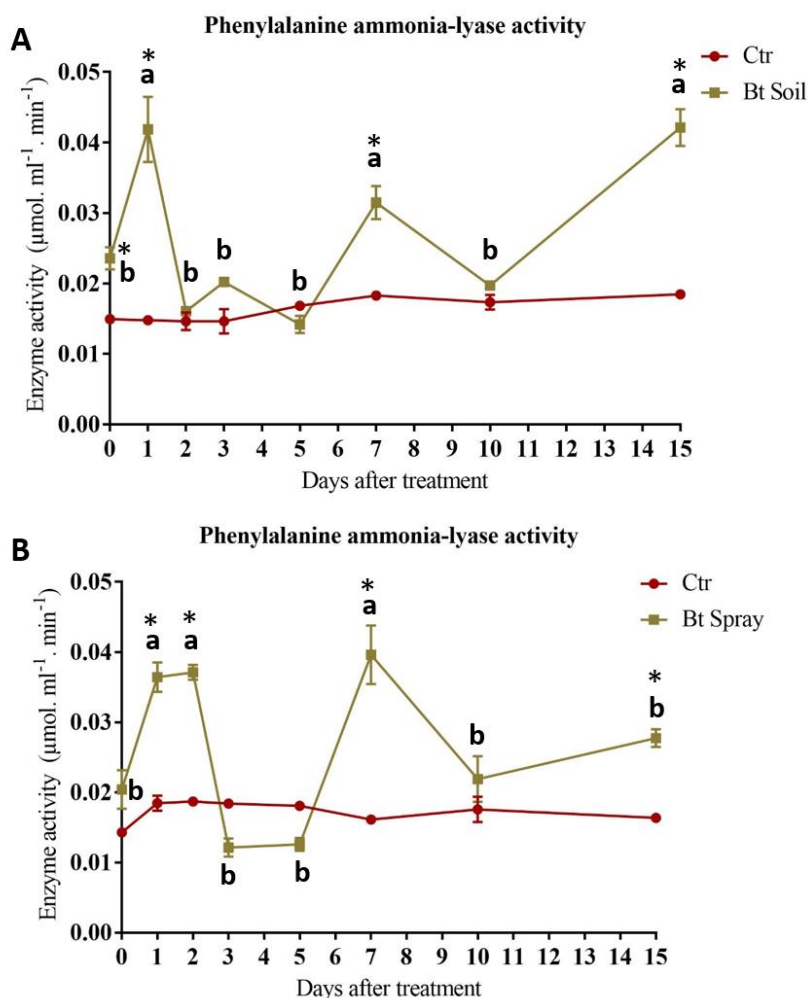
شکل ۷-۳ - میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ، در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی، تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی‌دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P < 0.05$)، در هر روز داده‌برداری با ستاره، مشخص شده است.

طبق نتایج به دست آمده در این رساله، در نتیجه ی برهم کنش باکتری Bt با گیاه گوجه فرنگی، سطح فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز افزایش پیدا کرده است. آنزیم اسکوربات پراکسیداز، یکی از مهم ترین آنزیم های آنتی اکسیدانی می باشد که در گیاهان برای غیر سمی کردن H_2O_2 ، تولید می شود. این آنزیم از آسکوربات، به عنوان دهنده ی الکترون، برای احیای H_2O_2 استفاده می کند (Dong-Jun et al., 2012).

۳-۳-۷- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز در گیاه های گوجه فرنگی، تحت اثر تیمار شدن با باکتری Bt، دچار تغییر شده است. به این ترتیب که، در برخی از روزهای داده برداری، فعالیت آنزیم PAL، افزایش معنی داری نسبت به شاهد داشته است. در هر دو تیمار، فعالیت آنزیم PAL، در روزهای یکم و هفتم و پانزدهم بعد از تلقیح، به اوج خود می رسد (شکل ۴-۷). سپس، بعد از روز هفتم، رویه ی کاهشی می گیرد، ولی مجدد، بعد از روز دهم، تا پایان روزهای داده برداری، فعالیت آنزیم، روند صعودی دارد.

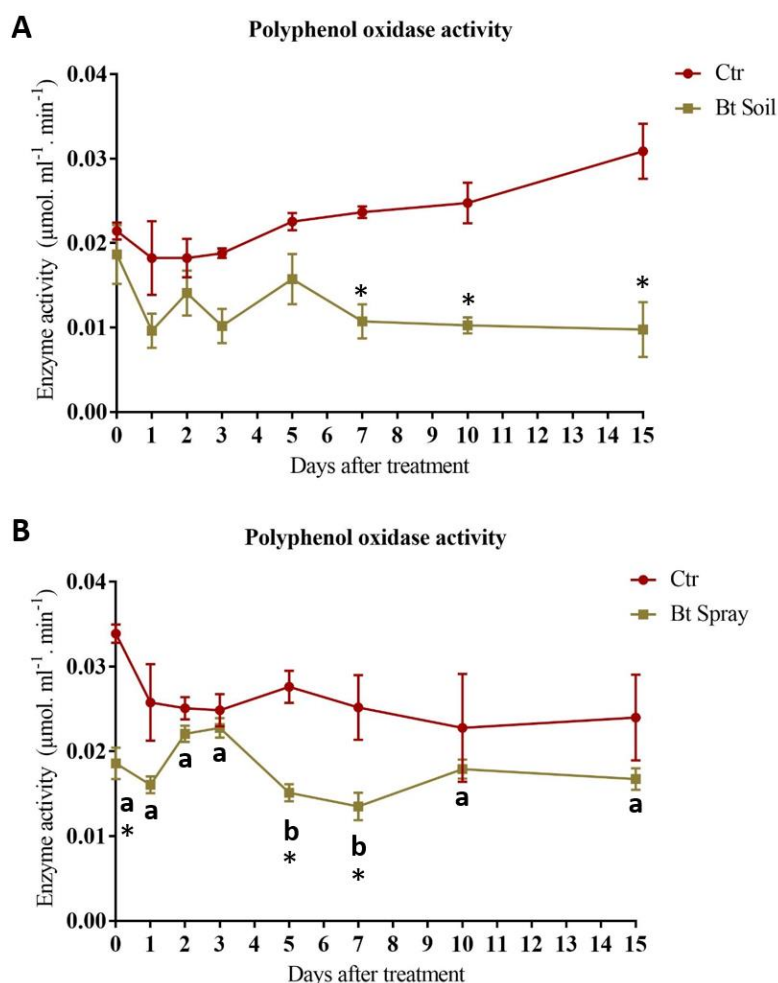
آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز، آنزیمی کلیدی در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید می باشد، هم چنین این آنزیم نقش اساسی در تولید فلاونوئیدها و سنتز لیگنین دارد. گزارش شده است که، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز، در ارتباط مستقیم با سیستم ایمنی بسیاری از گیاهان در مقابل حمله ی بیمارگرها می باشد (Thilagavathi et al., 2007).



شکل ۷-۴- میانگین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز (± خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد.

۷-۳-۴- فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

برهم‌کنش گیاه گوجه‌فرنگی و باکتری Bt، روی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز، اثر کاهشی داشته است. فعالیت آنزیم PPO، در هر دو تیمار خاک و پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، نسبت به شاهد، کاهش یافت (شکل ۷-۵). کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، در روزهای پنجم و هفتم مشاهده گردید. حال آنکه، در تیمار خاک، بین فعالیت آنزیم PPO، در طی روزهای مختلف اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($P = 0.1409$).



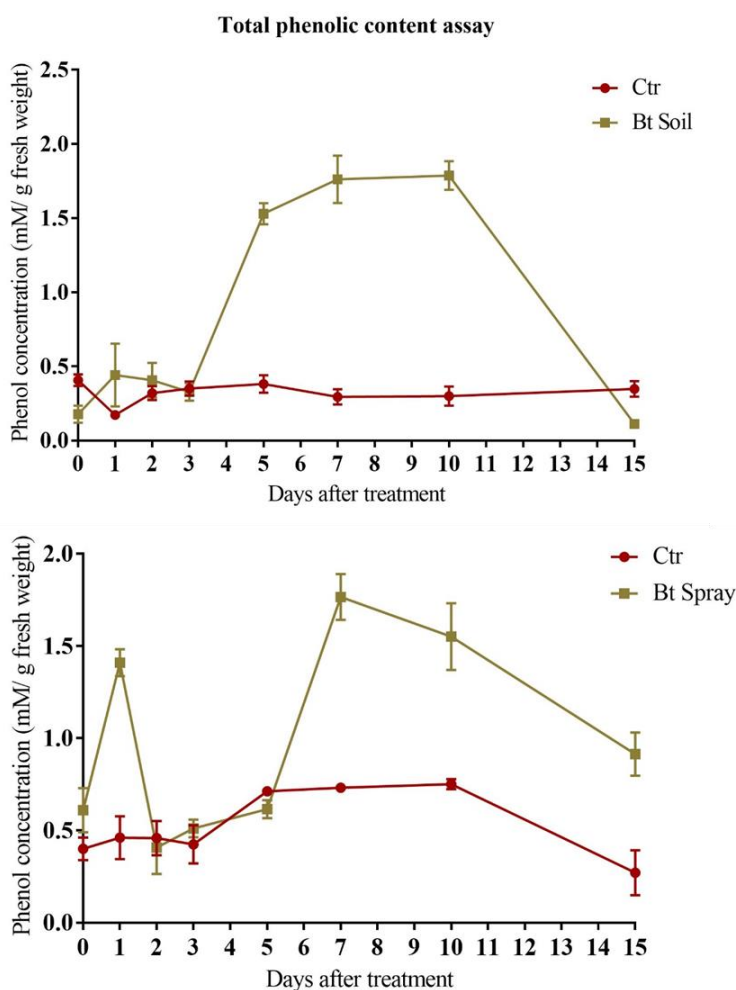
شکل ۷-۵- میانگین فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز (\pm خطای معیار) بر حسب $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ، در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. داده‌های نمایش داده شده در شکل، SE، می‌باشد.

آنزیم پلی فنول اکسیداز، در القای مقاومت در گیاهان در برابر حمله‌ی آفات و بیمارگرها نقش دارد. القای فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز به وسیله‌ی بیمارگرها، در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Schaller, 2008). در گیاه گوجه‌فرنگی، افزایش بیان و فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز، منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر باکتری بیمارگر گیاهی *Pseudomonas syringae* pv *tomato* شده است.

۷-۳-۵- محتوای فنولی

میزان ترکیبات فنولی در تیمار خاک، از روز سوم افزایش چشم‌گیری پیدا کرد تا اینکه در روز دهم پس از تلقیح، به اوج خود رسید و سپس، رویه‌ی کاهشی در پی گرفت. اما، در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های

هوایی، ترکیبات فنولی از ساعات اولیه تلقیح گیاه، نسبت به شاهد افزایش معنی داری پیدا کرد و یک روز پس از پاشش به اولین پیک خود رسید. پیک دوم، در روز هفتم، مشاهده گشت و سپس، مانند تیمار خاک، میزان ترکیبات فنولی کاهش پیدا کرد (شکل ۷-۶). بیشترین محتوای فنولی در تیمارهای خاک و پاشش روی اندام‌های هوایی، به ترتیب، ۱/۷۸۶ و ۱/۷۶۷ میلی مولار بوده است، که با هم اختلاف معنی دار ندارند ($P\text{-value}=0.7541$).

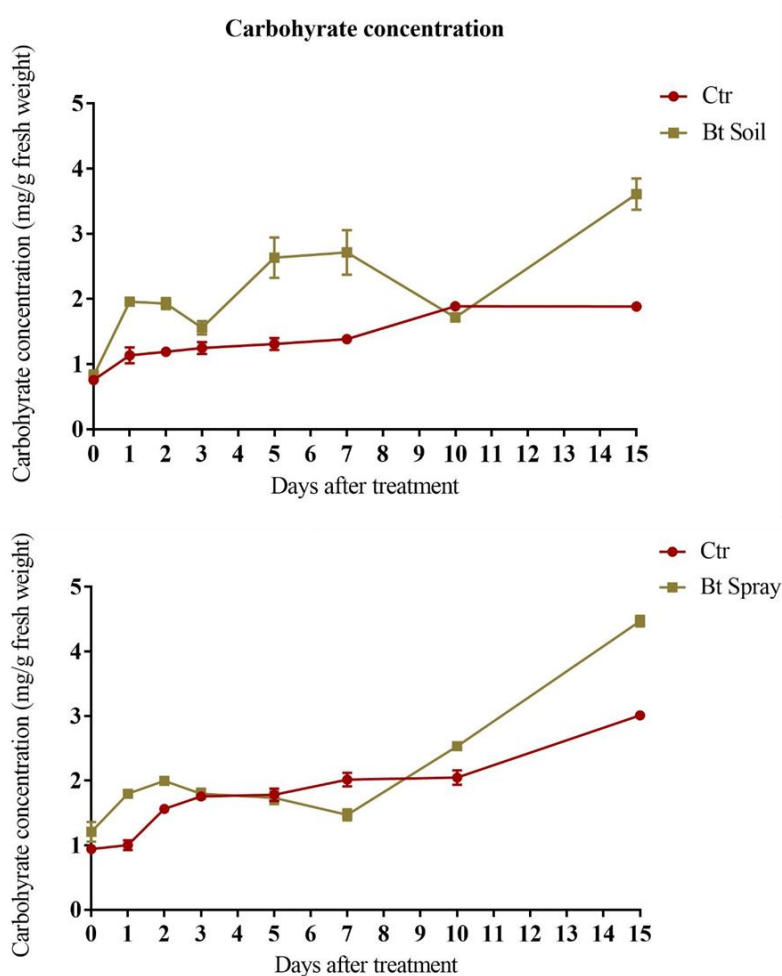


شکل ۷-۶- میانگین محتوای فنولی کل (\pm خطای معیار) بر حسب میلی مولار (mM/ g fresh weight)، در گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی، تفاوت معنی دار ($P<0.05$) در غلظت فنول در هر تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P<0.05$)، در هر روز داده- برداری با ستاره، مشخص شده است.

هم‌بستگی مستقیم و مثبت بین افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، تحت شرایط نامساعد، و تقویت دیواره‌های سلول گیاهی با ترکیبات فنولی، گزارش شده است (Mandal et al., 2011).

۷-۳-۶- غلظت کربوهیدرات محلول

تحت تأثیر تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری Bt، در تیمار خاک، غلظت کربوهیدرات محلول، نسبت به شاهد، افزایش پیدا کرده است (شکل ۷-۷).

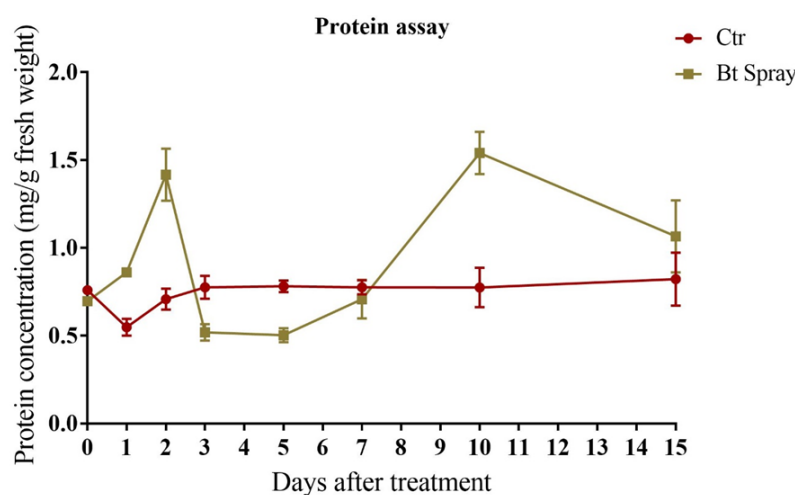
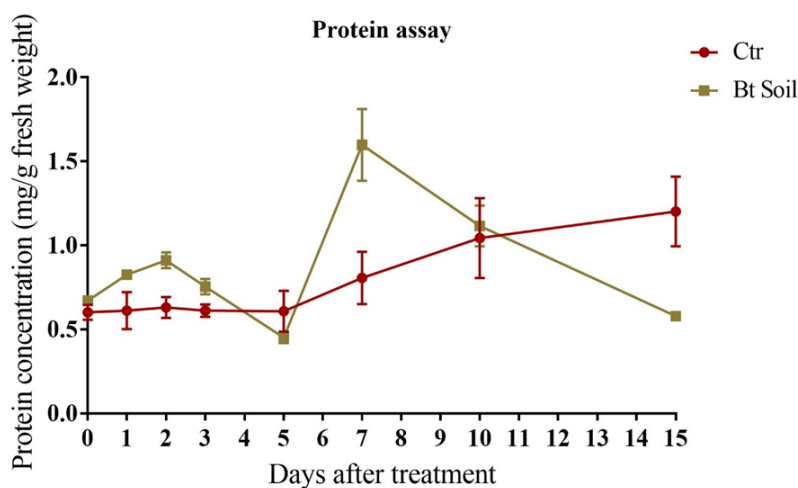


شکل ۷-۷- میانگین غلظت کربوهیدرات محلول (\pm خطای معیار) بر حسب mg/g fresh weight در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در غلظت کربوهیدرات در هر تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی‌دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P < 0.05$)، در هر روز داده‌برداری با ستاره، مشخص شده است.

پس از گذشت یک و پنج روز از تلقیح گیاه با باکتری Bt، به ترتیب به پیک اول و دوم خود می‌رسد. در نهایت نیز، تا آخرین روز آزمایش (روز پانزدهم)، غلظت کربوهیدرات موجود در بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی، روند صعودی دارد. اما در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، روز دوم پس از تلقیح، غلظت کربوهیدرات‌های محلول به اوج می‌رسد و سپس رویه‌ی نزولی پیش می‌گیرد. اما، بعد از روز هفتم، تا آخرین روز داده‌برداری، مجدد روند صعودی دارد (شکل ۷-۷).

۷-۳-۷- محتوای پروتئینی کل

غلظت پروتئین موجود در اندام‌های هوایی گیاه گوجه‌فرنگی، تحت تأثیر برهم‌کنش با باکتری Bt، قرار گرفته است. به طوری که، غلظت پروتئین کل موجود در تیمار خاک، در روزهای هفتم و پانزدهم پس از تلقیح، نسبت به شاهد، به ترتیب افزایش ($P=0.0002$) و کاهش ($P=0.0043$) داشته است. در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، در روزهای دوم و دهم پس از تلقیح افزایش غلظت پروتئین در نمونه‌های گیاهی تیمار شده، نسبت به شاهد، مشاهده گردید ($P<0.0001$). اما در نهایت، در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، مشابه تیمار خاک، غلظت پروتئین کل، پس از پیک دوم، تا آخرین روز آزمایش، رویه‌ی نزولی داشت (شکل ۷-۸). در حالی که، در مابقی روزهای آزمایش، محتوای پروتئین کل در تیمارها، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت.



شکل ۷-۸- میانگین غلظت پروتئین کل (\pm خطای معیار) بر حسب mg/g fresh weight در گیاه گوجه-فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی، تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در غلظت پروتئین در هر تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی‌دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P < 0.05$)، در هر روز داده‌برداری با ستاره، مشخص شده است.

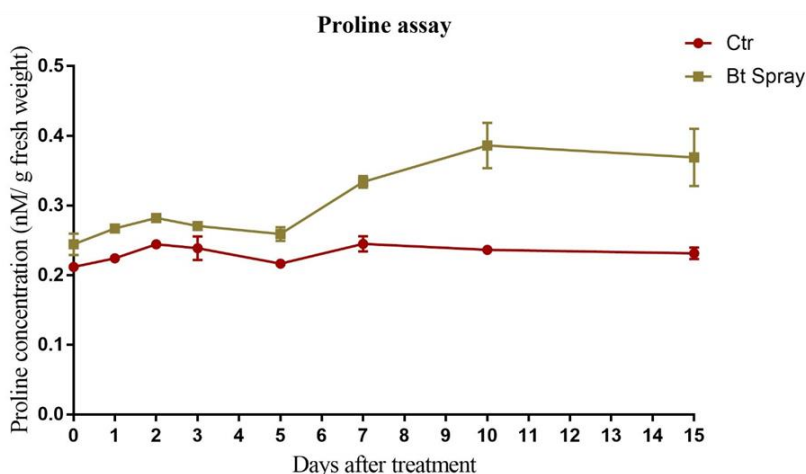
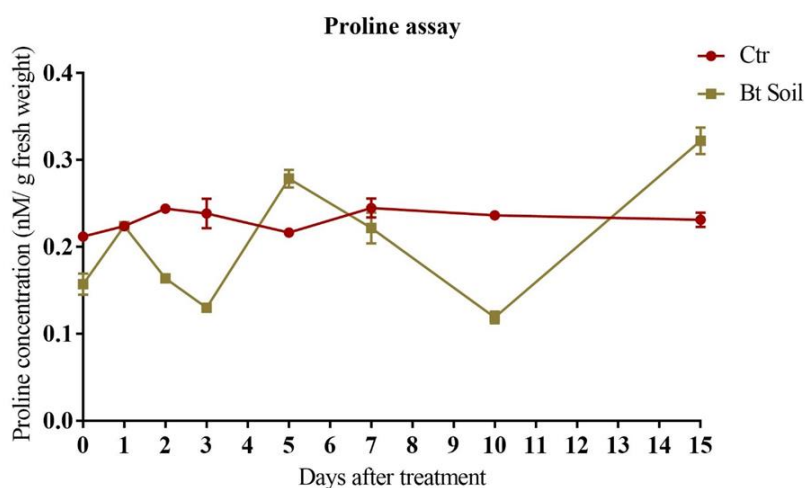
محتوای پروتئینی در گوجه‌فرنگی‌های تیمار شده با Bt، تفاوت چندانی با شاهد نداشت. در تیمار تلقیح خاک، در روز هفتم و در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، در روزهای دوم و دهم پس از تلقیح، افزایش غلظت پروتئین مشاهده گردید. پژوهش‌های پیشین، در مورد اثر آفت‌کش‌های شیمیایی روی گیاه، نشان داده‌اند

که، استفاده از سمومی چون ایمیداکلوپرید، سایپرمتترین و کلورپیریفوس، باعث کاهش محتوای پروتئینی گیاه مورد آزمایش شده است (Parween et al., 2012; Shakir et al., 2018).

۷-۳-۸- غلظت پرولین

غلظت پرولین، در گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با باکتری Bt، به عنوان یکی از مهم ترین متابولیت‌هایی که در بافت گیاهی در پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو، جمع می‌شوند تا از آسیب وارده به بافت گیاه در نتیجه‌ی تنش جلوگیری کند، مورد مطالعه قرار گرفت. محتوای فنولی گیاه‌های تیمار شده با Bt به روش تلقیح خاک، در روزهای اولیه آزمایش کمتر از وضعیت شاهد بوده است، اما در روزهای پنج و پانزدهم، روند صعودی در غلظت پرولین دیده می‌شود، که در مقایسه با تیمار، افزایش یافته است. در مورد تیمار پاشش Bt روی اندام‌های هوایی، نیز وضعیتی مشابه دیده می‌شود، که در روزهای اولیه‌ی تلقیح مستقیم گیاه، تفاوت معنی‌داری بین غلظت پرولین در شاهد و تیمار مشاهده نشد (شکل ۷-۹). اما از روز هفتم پس از تلقیح، پرولین در سلول‌های گیاهی تجمع یافت و تفاوت معنی‌داری با شاهد خود داشت (در روزهای ۷، ۱۰ و ۱۵ پس از تلقیح معنی‌دار بود). در نتیجه، بر اثر برهم‌کنش گیاه گوجه فرنگی با باکتری Bt، تجمع پرولین، در هر دو تیمار در روزهای پایانی آزمایش، بیشتر از شاهد بود.

پرولین، یکی از مهم ترین ترکیباتی است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی، در پاسخ به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، سرما، فقر مواد غذایی، عناصر سنگین، حمله‌ی بیمارگرها و اسیدپتته‌ی بالا، تولید می‌شود. پرولین، مولکول بدون بار کوچکی است که در pH فیزیولوژی، به راحتی در آب قابل انحلال است، در نتیجه تجمع پرولین در سلول‌های گیاهی در شرایط تنش، می‌تواند آسیب سلولی احتمالی را کاهش دهد. همچنین، پرولین، از طریق تسخیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن، به حفظ سلول‌های گیاهی کمک می‌کند. سلول‌های گیاهی این توانایی را دارند که در صورت نیاز، پرولین را ذخیره و یا به سرعت تجزیه کنند. در شرایط تنش اسمزی، سلول‌های گیاهی سطح پرولین موجود در بافت‌های گیاه را به سرعت افزایش می‌دهند و پرولین را در سلول‌ها ذخیره می‌کنند (Trovato et al., 2008).



شکل ۷-۹- میانگین غلظت پرولین کل (\pm خطای معیار) بر حسب میلی‌مولار (nM/g fresh weight)، در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt. تصویر A؛ تیمار خاک و تصویر B؛ تیمار پاشش روی اندام‌های هوایی، را نشان می‌دهد. حروف در هر نقطه‌ی زمانی، نشان دهنده‌ی، تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در غلظت پرولین در هر تیمار، طی روزهای متفاوت است و تفاوت معنی‌دار مقایسه‌ی تیمار و شاهد ($P < 0.05$)، در هر روز داده‌برداری با ستاره، مشخص شده است.

افزایش و تجمع پرولین در سلول‌های گیاهی، بر اثر القای بیان ژن *p5cs*¹ و سرکوب ژن *proDH*² می‌باشد. زمانی که تنش در گیاه از بین برود، به علت اینکه پرولین اضافی مجتمع در سلول‌های گیاهی، سمی

¹ Pyrroline-5-carboxylate synthetis

² Proline dehydrogenase

است، غلظت پرولین به شدت کاهش می‌یابد. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که، غلظت و تجمع پرولین در سلول‌های گیاهی که تحت اثر بیمارگرها قرار گرفته‌اند، به شدت افزایش می‌یابد (Fabro et al., 2004; Trovato et al., 2008). در نتیجه، تعیین غلظت اسید آمینه‌ی پرولین، برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیکی و تحمل تنش در گیاهان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

سلول‌های گیاهی توانایی تولید و غیر سمی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارند. در شرایط عادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، به صورت اجتناب ناپذیر، به عنوان محصولات فرعی واکنش در گیاهان تولید می‌شوند. سلول‌های گیاهی سازوکارهایی دارند که غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به حداقل خود برسانند. گیاهان در مواجهه با بیمارگرهای بالقوه، انفجارهای اکسیداتیو ایجاد می‌کنند که به موجب آن رادیکال‌های چون؛ سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل تولید می‌شود. این انفجارهای اکسیداتیو، سیستم دفاعی گیاهی را در دو فاز تحریک می‌کند؛ فاز اول، دوره‌ی کوتاهی دارد و خیر تخصصی است و ظرف چند دقیقه پس از شناسایی بیمارگر توسط گیاه، آغاز می‌گردد. در حالی که فاز دوم؛ طولانی‌تر می‌باشد و مدتی پس از شناسایی بیمارگر توسط گیاه آغاز می‌شود. فاز دوم انفجارهای اکسیداتیو، القای بیان ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی، منجر به بروز مقاومت در برابر بیماری می‌گردد (Apel and Hirt 2004).

وقوع انفجارهای اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بلافاصله بعد از آلوده شدن گیاه به بیمارگر اتفاق می‌افتد. در پژوهش‌هایی که سلول‌های گیاهی با بیمارگر تلقیح شده‌اند، برهم‌کنش گیاه-بیمارگر، یک تا دو دقیقه بعد از آلوده‌سازی شروع شده، پس از چند دقیقه به بیشینه رسیده و ظرف ۳۰ الی ۶۰ دقیقه تمام شده است. اما زمانی که قطعاتی از بافت گیاه به بیمارگر آلوده گشته، پاسخ گیاه بعد از سپری شدن مدت زمان طولانی‌تری، ۸ تا ۱۲ ساعت پس از تلقیح، شروع شده است (Wojtaszek 1997). در این رساله نیز، در مورد آنزیم‌های CAT و PAL، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، دو ساعت بعد از تلقیح گیاه با اسپور و کریستال باکتری Bt، (در روز صفر) مشاهده گردید.

نتایج حاصل از واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گوجه‌فرنگی به باکتری Bt در این رساله، با نتایج پژوهش‌هایی که، اثر باکتری‌های بیمارگر و یا غیر بیمارگر (باکتری‌های مفید و یا عوامل آنتاگونیست) را روی

گیاهان مختلف بررسی کرده بودند، مقایسه گردید. مشابه نتایج به دست آمده در این رساله، در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری گرم منفی *R. solanacearum*، پراکسید هیدروژن شناسایی شده است و با افزایش جمعیت باکتری بیمارگر، رادیکال‌های آزاد تولید شده در گیاه نیز، افزایش یافته است (Flores-Cruz and Allen, 2009).

نتایج این رساله با نتایج به دست آمده در پژوهش Mandal و همکاران (۲۰۱۱) مشابه بود. به این ترتیب که، ریشه‌های دو رقم مختلف گوجه‌فرنگی، رقم AM؛ حساس و رقم BT-10؛ مقاوم به پوسیدگی باکتریایی، با ۲/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *Ralstonia solanacearum* با غلظت $10^6 \times 7$ CFU.ml⁻¹، تلقیح گشت. تلقیح گوجه‌فرنگی با باکتری *R. solanacearum* باعث افزایش تولید H₂O₂ در هر دو رقم گوجه‌فرنگی شد. بعد از اولین انفجار اکسیداتیو، کاهش شدید در تولید H₂O₂ در هر دو رقم مشاهده گشت. این روند کاهش در مورد رقم حساس (AM) ادامه داشت در حالی که، در رقم مقاوم (BT-10)، مجدداً افزایش چشم‌گیر در تولید H₂O₂ دیده شد. پس از پیک دوم تولید H₂O₂ در رقم BT-10، تجمع H₂O₂، به تدریج کاهش پیدا کرد. فعالیت دو آنزیم SOD و CAT، ۱۲ ساعت بعد از تلقیح گیاه با بیمارگر، افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD، در رقم حساس گوجه‌فرنگی، در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح گزارش شده است. حال آنکه، در مورد رقم مقاوم، روند افزایشی فعالیت آنزیم SOD، تا پایان مدت زمان آزمایش مشاهده گردید. در مورد آنزیم CAT، نیز فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم حساس بوده و تا پایان آزمایش، روند افزایشی داشته است. فعالیت آنزیم GPX، بعد از سپری شدن مدت زمان کوتاهی از تلقیح گیاه، در هر دو رقم، به‌شدت افزایش نشان داده است. فعالیت GPX، در رقم مقاوم در دو بازه‌ی زمانی ۲۴ و ۹۶ ساعت بعد از تلقیح، به اوج خود می‌رسد. فعالیت آنزیم APX، نیز در رقم مقاوم، نسبت به رقم حساس و شاهد، به‌شدت افزایش یافته است و روند صعودی را طی می‌کند. قابل ذکر است که، بیشترین میزان محتوای فنولی در رقم مقاوم تلقیح شده با بیمارگر، یافت شده، که در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح به اوج خود رسیده است.

نتایج این رساله برای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، دو فاز افزایشی نشان داد، که این مسئله در بسیاری از برهم‌کنش‌های گیاه-بیمارگر مشاهده شده است (Bargabus et al., 2003; Mandal et al., 2011). دلایل

متعددی برای مشاهده‌ی دو فاز افزایشی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، در برهم‌کنش‌های گیاه-بیمارگر وجود دارد. نشان داده شده است که، H_2O_2 برای تقویت فیزیکی دیواره‌ی سلول‌های گیاهی، از طریق ارتباط بین پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی و پراکسیدازهایی که فرآیند لیگنین‌سازی را کاتالیز می‌کنند، ضروری می‌باشد (Lamb and Dixon, 1997). از طرف دیگر، غلظت زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، به‌طور مستقیم برای میکروارگانیسم‌ها سمی می‌باشد. در نتیجه، غلظت بیشتر H_2O_2 در ارقام مقاوم گیاه، که در بسیاری از پژوهش‌ها به آن اشاره شده است (Tomankova et al., 2006; Chen et al., 2008)، توجیه‌پذیر است. نتایج این پژوهش نیز، برای فعالیت آنزیم‌های ASC، CAT و PAL، دو حد بیشینه، نشان می‌دهد. علاوه بر دلایل ذکر شده، گزارش شده است که باکتری Bt، توانایی مهاجرت از ریشه به سمت برگ گیاهی که بذر یا خاک آن به Bt تلقیح شده، را دارد (Damgaard 2000; Bizzarri and Bishop, 2007; Maduell et al., 2007; Gomes Monnerat et al., 2009). در نتیجه در این پژوهش، به دلیل مهاجرت باکتری Bt از خاک به برگ گیاه و همچنین به دلیل توانایی باکتری در پراکنده شدن در گیاه و کلونیزه کردن گیاه، دو فاز افزایشی در فعالیت آنزیم‌ها دیده شد. فاز اول که بلافاصله بعد از تلقیح گیاه مشاهده گردید، به دلیل مایه تلقیح اولیه، و فاز دوم، احتمالاً به دلیل اندوفیت شدن باکتری در گیاه گوجه‌فرنگی، می‌باشد.

برهم‌کنش باکتری *B. subtilis* با گیاه میزبان، در پژوهش‌های متعددی، مورد بررسی قرار گرفته است. باکتری *B. subtilis*، یکی از آنتاگونیست‌های مؤثر در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی است. این باکتری از طرفی، از طریق تولید آنزیم‌های مانند کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز، و آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کنترل عوامل بیماری‌های خاک‌زاد می‌شود و از سوی دیگر، از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در سیستم ایمنی، باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاه می‌شود. باکتری *B. subtilis* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز، پراکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیا-لیاز می‌گردد (Jayaraj et al., 2004; Chen et al., 2010). مشابه نتایج حاصل از برهم‌کنش سویه‌ی AzLp با گیاه گوجه‌فرنگی در این مطالعه، سویه‌ی AR12 از باکتری *B. subtilis*، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، PAL، PPO و SOD در گیاه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با باکتری، گردید. این مسئله در جلوگیری از شیوع پژمردگی‌های باکتریایی و القای مقاومت در گیاه، اهمیت دارد (Li et al., 2008). در حالی که، نتایج مطالعه Jayaraj و همکاران (۲۰۰۴)، در مورد کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT و PAL، با این رساله مغایرت

دارد. نتايج پاشش سويهی *B. subtilis* AUBS1 روي گياه برنج، از طريق افزايش سطح فعاليت آنزيمهاي PAL و CAT، بيماری سوختگی غلاف برنج را به طور معنی داری کاهش می دهد (Jayaraj et al., 2004).

اثر کمی باکتری *B. subtilis* روي فعاليت آنزيمهاي سيستم ايمني گياه خيار برای کنترل بيماری پژمردهگی فوزاریومی، توسط Chen و همکاران (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است. بيشترين ميزان فعاليت آنزيم پراکسيداز در گياه خيار، زمانی بوده است که گياه با باکتری *B. subtilis* تلقیح شده بود. نتايج به دست آمده در مورد فعاليت آنزيم کاتالاز، در اين رساله، در گياه گوجه فرنگی، مشابه نتايج پژوهش Chen و همکاران (۲۰۱۰) می باشد. در نتیجهی تیمار بذر گياه خيار و هم چنين خاک اطراف ریشه، با باکتری *B. subtilis* عامل کنترلی بيماری پوسيدگی فوزاریومی، بيشترين ميزان فعاليت آنزيم پراکسيداز، در تیمار تلقیح گياه با باکتری *B. subtilis* مشاهده شده است. در تیماری که بذور گياه خيار به سوسپانسيون باکتری آغشته شده بودند، از روز اول آزمایش تا روز پنجم، فعاليت آنزيم پراکسيداز روند صعودی داشته است. سپس در روز پنجم افت شديد در فعاليت آنزيم مشاهده شده، اما مجدد تا روز يازدهم، فعاليت آنزيم رويهی صعودی داشته است. فعاليت آنزيم PAL، در گياههاي خيار تیمار شده با باکتری *B. subtilis*، نیز مشابه نتايج پژوهش ما، می باشد (Chen et al., 2010). به طوری که، فعاليت آنزيم PAL در تیمار بيشتر از شاهد بوده است و در گياههاي تیمار شده، روند افزايشی و کاهشی متفاوتی در فعاليت آنزيم PAL، طی ۱۵ روز داده برداری مشاهده می شود. بيشينه فعاليت آنزيم PAL، در تیمار، در روزهاي پنجم و يازدهم پس از تلقیح گياه ثبت گردیده است. اين نتايج، با پژوهش Chen و همکاران (۲۰۱۰)، در ارتباط با فعاليت آنزيم PPO در گياههاي خيار تیمار شده با باکتری *B. subtilis* مغايرت دارد. در پژوهش ذکر شده، ميزان فعاليت آنزيم PPO، با وجود داشتن روندی متغير، در گياهان تیمار شده نسبت به شاهد بيشتر بوده است.

سويهی GS1 از باکتری Bt، باعث القای مقاومت به قارچ *Rhizoctonia solani* در گياهان خيار می شود. مشابه نتايج حاصل در پژوهش حاضر، فعاليت آنزيمهاي گاياکول پراکسيداز، آسکوربات پراکسيداز و پلی فنول اکسيداز در گياه خيار تیمار شده با باکتری Bt، نسبت به شاهد افزايش یافته است. اما، بيشترين ميزان فعاليت آنزيمهاي آسکوربات پراکسيداز و پلی فنول اکسيداز، در گياههاي خيار تیمار شده با قارچ *R. solani*

می‌باشد. به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در سیستم ایمنی به وسیله‌ی باکتری Bt، بیماری بوته میری گیاه خیار سرکوب شده است (Dong-Jun et al., 2012).

بر اثر تلقیح گیاه ذرت با گونه‌های مختلفی از باکتری *Bacillus* شامل؛ *B. licheniformis*، *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens thuringiensis*، در شرایط غیر تنش، تغییری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز، مشاهده نشد. اما در شرایط تنش خشکی، افزایش چشم‌گیر و معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مذکور، در گیاه‌های ذرت تلقیح شده، نسبت به گیاه‌های تلقیح نشده با باکتری‌های *Bacillus spp.* مشاهده گشت (Vardhalajula et al., 2011). نتایج حاکی از آن بود که، گیاه ذرت به تلقیح شدن با *Bacillus spp.* واکنش فیزیولوژیکی نشان می‌دهد، که می‌تواند اثرات منفی حاصل از تنش خشکی را کاهش دهد.

بر اساس پژوهش Egamberdieva و همکاران (۲۰۱۷)، استفاده از سویه‌ی اندوفیت *B. NUU4 subtilis*، باعث بهبود پارامترهای رشدی گیاه نخود (*Cicer arietinum*)، افزایش مقاومت نسبت به تنش شوری و کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ *F. solani* گشت. تلقیح گیاه نخود با باکتری *B. subtilis* منجر به کاهش تولید H_2O_2 و افزایش محتوای پرولینی گیاه گردید. در پژوهش حاضر نیز، محتوای پرولینی گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری Bt، نسبت به شاهد افزایش یافت.

بر اساس نتایج به دست آمده در این فصل از رساله، این طور به نظر می‌رسد که گیاه گوجه‌فرنگی در ابتدا، زمانی که با غلظت زیادی از باکتری Bt مواجه می‌شود، آن را به‌عنوان یک بیمارگر تلقی می‌کند. این مسئله باعث فعال شدن سیستم ایمنی گیاه گوجه‌فرنگی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های مربوط به سیستم ایمنی گیاه، نقش مهمی در القای مقاومت در گیاه و سرکوب عوامل بیماری‌زای گیاهی احتمالی را دارد، در نتیجه این مسئله جنبه‌ی مفید و مهمی از برهم‌کنش بین باکتری Bt و گیاه میزبان را نشان می‌دهد. سپس به دلیل بیمارگر نبودن باکتری Bt برای گیاه میزبان، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به وضعیت طبیعی گیاه باز می‌گردد. در نتیجه، در صورت حمله‌ی یک عامل بیماری‌زای گیاهی، به گیاهی که مورد پاشش و یا تلقیح Bt قرار گرفته است، گیاه حساسیت کمتر و توانایی بیشتری برای مبارزه با عامل بیماری‌زا دارد.

فصل هشتم

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

پروتئین‌های موجود در اجسام کریستالی سویه‌های Bt تعیین و پتانسیل حشره‌کشی آن‌ها پیش‌بینی گشت. اما، آزمون‌های زیست‌سنجی (با حشرات و یا با رده‌های سلولی)، به‌عنوان مرحله‌ای ضروری و اجتناب‌ناپذیر در مراحل تعیین ویژگی سویه‌های Bt، اطلاعات جامعی از فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی سویه‌های Bt، فراهم آورد. این یافته‌ها منجر به معرفی سه سویه‌ی AzLp، IE-2 و IP-2، به‌عنوان نامزدهای مناسبی برای تولید حشره‌کش‌های زیستی بر پایه‌ی Bt، گشت. زیرا، این سه سویه، با داشتن پروتئین‌های کریستالی حشره‌کش؛ Cry1Aa، Cry1Ab، Cry1Ac، Cry1Ca و Cry1Da، و فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی، و همچنین عدم تولید بتا-اگزوتوکسین، پتانسیل مناسبی برای کنترل آفات بال‌پولک‌دار، دارند.

- معرفی ژن جدید *cryIIa38*

در بخش دوم، روی هم‌سانه‌سازی ژن *cryIIa*، به‌عنوان ژن جدید یافت شده در سویه‌ی IE-1، تمرکز گردید. ژن *cryIIa38* که در نتیجه‌ی غربال‌گری ژن‌های سویه‌ی IE-1 *B. thuringiensis*، شناخته شده بود، با موفقیت هم‌سانه‌سازی گردید. توالی کامل این ژن با طول ۲۱۶۰ نوکلئوتید، پروتئینی با طول ۷۲۰ اسیدآمینو را رمز می‌کند. توکسین جدید شناسایی شده، با نظر کمیته‌ی نام‌گذاری توکسین‌های باکتری Bt، (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)، CryIIa38، نام گرفت. پس از بیان، استخراج و خالص‌سازی پروتئین CryIIa38، فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی پروتئین به دست آمده، مطالعه شد. ویژگی‌های منحصر به فرد توکسین‌های خانواده‌ی CryII، از همه مهم‌تر؛ نحوه‌ی اثر متفاوت نسبت به سایر پروتئین‌های Cry، معیار انتخاب این ژن قرار گرفت. ویژگی‌های ساختاری، فعالیت حشره‌کشی و سلول‌کشی پروتئین CryIIa38، با پروتئین‌های CryIIa38-II16V و CryIIa7، مقایسه گردید. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ژن *cryIIa38* کاندید مناسبی برای ایجاد ذرت تراریخت مقاوم به کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، پیش‌توکسین‌های هر سه پروتئین مورد مطالعه؛ CryIIa38، CryIIa38-II16V و CryIIa7، وزن مولکولی یکسانی، حدوداً ۸۰ کیلودالتون، داشتند. همچنین، توکسین فعال شده با آنزیم تریپسین نیز، در هر سه پروتئین بررسی شده، هسته‌ی مقاومی با اندازه‌ی ۵۰ کیلودالتون، تولید کرد. نتایج حاصل از زیست‌سنجی سه پروتئین مورد مطالعه نشان داد که، پیش‌توکسین هر سه پروتئین برای لاروهای *G. molesta*، به‌شدت زهرآگین بودند. همچنین، لاروهای *O. nubilalis*، حساسیت زیادی به پروتئین CryIIa38، نشان دادند.

در حالی که، لاروهای چهار گونه‌ی *S. littoralis*، *S. exigua* و *H. armigera* و *M. brassicae* حساسیت چندانی به پروتئین‌های CryIIa مورد استفاده نداشتند.

- تغییر فعالیت حشره‌کشی توکسین Bt به دنبال تغییر در تنها یک اسید آمینه

قابل ذکر است که دو توکسین CryIIa38 و CryIIa38-II16V، با وجود تفاوت تنها در یک اسید آمینه، فعالیت حشره‌کشی متفاوتی داشتند. تغییر یک اسید آمینه در دومین I، پروتئین‌های Cry، منجر به بروز تغییر در فعالیت حشره‌کشی پروتئین شده است. به این ترتیب که، پیش‌توکسین و توکسین فعال شده‌ی CryIIa38، بیشترین زهرآگینی را روی لاروهای سن یک *G. molesta* داشتند. همچنین، پیش‌توکسین CryIIa38، باعث مرگ صد درصدی لاروهای *O. nubilalis* گشت. در حالی که، در مورد CryIIa38-II16V، تنها پیش‌توکسین این پروتئین برای لاروهای *G. molesta*، زهرآگین بوده است.

- چالش الیگومریزاسیون توکسین‌های Bt در مدل اتصال متوالی: ارتباط بین تشکیل ساختارهای الیگومری و بیماری‌زایی

در بخش سوم، با توجه به منحصر به فرد بودن توکسین‌های خانواده‌ی CryII، و متفاوت بودن نحوه‌ی عملکرد توکسین‌های CryII باکتری Bt، توانایی تشکیل ساختارهای الیگومری در توکسین CryIIa7، مورد مطالعه قرار گرفت. سپس، ارتباط بین تشکیل ساختارهای الیگومری و بیماری‌زایی توکسین CryIIa7، مورد سوال قرار گرفت. بنابراین، الیگومریزاسیون پروتئین‌های CryIIa7، بعد از انکوبه شدن با BBMV میزبان‌های حساس و غیر حساس و همچنین رده‌ی سلولی حشرات، برای اولین بار در دنیا، با استفاده از تکنیک Western blot مورد مطالعه قرار گرفت. یافته‌های این رساله نشان می‌دهد که، توکسین CryIIa7، تنها پس از انکوبه شدن قطعاتی از غشای سلول‌های پوششی روده‌ی میزبان حساس سخت‌بالپوش، *L. decemlineata*، ساختارهای الیگومری تشکیل دادند. هیچ الیگومری پس از اینکه پروتئین CryIIa7، در معرض میزبان‌های حساس و غیر حساس بال‌پولکدار قرار گرفت، تشکیل نشد. بنابراین، در نحوه‌ی اثر توکسین‌های Cry سه دومینی، بر اساس مدل اتصال متوالی، تشکیل الیگومر برای همه‌ی توکسین‌های Cry و تمامی آفات میزبان، عمومیت ندارد. بر اساس نتایج این رساله، تشکیل الیگومر مرحله‌ای مهم، اما نه لزوماً ضروری، برای زهرآگینی توکسین CryIIa7 می‌باشد.

- فعالیت قارچ‌کشی و باکتری‌کشی در تمام سویه‌های Bt عمومیت ندارد.

در بخش چهارم از رساله، با توجه به یافتن سویه‌هایی مناسب از باکتری Bt، با دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی وسیع روی آفات بال‌پولکدار، دامنه‌ی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های Bt نیز علیه باکتری و قارچ بیمارگر گیاهی، *Erwinia* sp. و *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*، نیز بررسی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، فعالیت ضد میکروبی (ضد قارچی و ضد باکتریایی)، در سویه‌های مورد بررسی در این رساله، علیه عوامل بیمارگر گیاهی، *Erwinia* sp. و *F. oxysporum* subsp. *lycopersici*، مشاهده نگردید.

- بروز پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیربولوژیکی در گیاه گوجه‌فرنگی تلقیح شده با Bt

در بخش پنجم از رساله، اثرات متابولیسمی و بیوشیمیایی سویه‌های ایرانی از باکتری Bt روی سلول‌های گیاهی، در قالب پاشش روی شاخ و برگ گیاه، و تلقیح خاک اطراف ریشه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی، مورد بررسی قرار گرفت. واکنش گیاه گوجه‌فرنگی به باکتری Bt، با اندازه‌گیری پارامترهای؛ کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پلی‌فنول اکسیداز (PPO) و فنیل‌آلانین آمونیا-لیاز (PAL)، و غیر آنزیمی؛ اندازه‌گیری پروتئین، محتوای فنولی کل، کربوهیدرات محلول و پرولین، مطالعه گردید. به طور کلی، بر اساس نتایج به دست آمده، تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری Bt، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، گشت. در نتیجه، افزایش فعالیت آنزیم‌های مربوط به سیستم ایمنی گیاه، نقش مهمی در القای مقاومت در گیاه و سرکوب بیماری‌های احتمالی را دارد.

به‌طور خلاصه، در این رساله، ویژگی‌های سویه‌های ایرانی باکتری Bt، از نقطه نظر محتوای ژنی، ترکیب پروتئین‌های کریستال، دامنه‌ی فعالیت حشره‌کشی، فعالیت ضد میکروبی و اثرات متابولیسمی و بیوشیمیایی روی سلول‌های گیاهی، تعیین گردید. این مطالعات، منجر به معرفی ژن جدید *cryIIa38*، در سویه‌ی Bt IE-1، گشت. پروتئین *CryIIa38*، پتانسیل حشره‌کشی مناسبی برای کنترل کرم هلو و کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت، دارد. همچنین، پروتئین *CryIIa38*، به دلیل داشتن نحوه‌ی اثری متفاوت از سایر پروتئین‌های سه‌دومینی *Cry*، می‌تواند به صورت هم‌زمان با سایر پروتئین‌های *Cry*، برای به‌تعمیق انداختن بروز مقاومت در حشرات، مورد استفاده قرار بگیرد. از سوی دیگر، سویه‌های مورد بررسی از باکتری Bt فعالیت ضد میکروبی برای کنترل عوامل

بیماری زای گیاهی با تمرکز روی باکتری *Erwinia* sp. و قارچ *F. oxysporum* subsp. *lycopersici* را نداشتند. اما با توجه به پاسخ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول های گیاه گوجه فرنگی به باکتری Bt و افزایش سطح فعالیت سیستم ایمنی، در القای مقاومت در گیاه و سرکوب بیماری های احتمالی، نقش مهمی ایفا می کنند. نتایج این رساله منجر به معرفی سه سویه AzLp، IE-2 و IP-2، و توکسین Cry1Ia38 از باکتری Bt شد که از پتانسیل زیادی برای کنترل آفات بال پولکدار برخوردار بودند و همچنین اثر مطلوب روی گیاه میزبان داشتند. بنابراین استفاده از سه سویه AzLp، IE-2 و IP-2 در تولید حشره کش های زیستی بر پایه ی Bt و بهره گیری از توکسین Cry1Ia38 برای تولید محصولات Bt توصیه می گردد.

۸-۲- پیشنهادها

برای مطالعات تکمیلی این رساله، پیشنهاد می‌شود موارد زیر مورد بررسی قرار گیرد:

- تمرکز غربال‌گری اولیه روی زهرآگینی سویه‌های Bt، علیه آفتی از راسته‌ی دوبالان و یا سخت‌بالپوشان
- مطالعات تکمیلی روی سویه‌ی KhF: بررسی توالی کامل ژنوم این سویه، انجام آزمون‌های زیست‌سنجی با آفتی از راسته‌های دیگر (به غیر از بال‌پولکداران)
- تعیین آسیب سلول‌های گیاهی، از طریق تغییر در نفوذپذیری غشاء، به وسیله نشت الکترولیت‌ها.
- آزمون زنده‌مانی سلول‌های گیاهی با روش کاهش تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC)
- تمرکز روی ژن‌های اختصاصی برای آفتی از راسته‌های دوبالان و سخت‌بالپوشان
- غربال‌گری بر اساس ژن‌های زهرآگین برای موجوداتی خارج از دنیای حشرات (نماتدها، کنه‌ها، پروتوزوئرها و ...)
- فعال کردن پیش‌توکسین‌های Cry1Ia38 و Cry1Ia38-II16V، با عصاره‌های روده‌ی میانی حشرات حساس
- بررسی گیرنده‌های توکسین‌های Cry1Ia38 و Cry1Ia38-II16V، در حشرات حساس
- نشان‌دار کردن پیش‌توکسین Cry1Ia7، و بررسی ساختارهای الیگومری در پیش‌توکسین
- بررسی فعالیت اندوفیتی سویه‌های Bt در گیاه میزبان
- بررسی اثرات متابولیسمی اندوفیت شدن Bt روی گیاه میزبان

منابع مورد استفاده

۱. خرم‌نژاد، آ. ۱۳۹۱. جداسازی و تعیین ویژگی‌های جدایه‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* از زیستگاه‌ها و میزبان‌های متفاوت و زهرآگینی آن‌ها روی شب‌پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xylostella*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، ۱۱۵ صفحه.
۲. مزربان، ر. و صالحی، غ. ۱۳۸۴. جداسازی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner از خاک‌های زراعی ایران. مجله دانش نوین کشاورزی. شماره دوم.
3. Abdullah MAF, Alzate O, Mohammad M, McNall RJ, Adang MJ, Dean DH. 2003. Introduction of Culex toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 69:5343–5353.
4. Abe Y, Inoue H, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T, Kitada S. 2017. Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *J Invertebr Pathol* 142:71–81.
5. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.
6. Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2:875–877.
7. Alper M, Tatlipinar A, Civelek HS, Poyraz B, Güneş H, Çöl B, Özkan C. 2014. Distribution, occurrence of cry genes, and lepidopteran toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolated from fig tree environments in Aydın Province. *Turk J Agric* 38 2014: 898–907.
8. Alzate O, Osorio C, Florez AM, Dean DH. 2010. Participation of valine 171 in alpha-Helix 5 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in translocation of toxin into *Lymantria dispar* midgut membranes. *Appl Environ Microbiol* 76:7878–7880.
9. Anderson AJ, Rogers K, Tepper CS, Blee K, Cardon J. 1991. Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. *Physiol Mol Plant Pathol* 38:1–13.
10. Andow DA, Olson DM, Hellmich RL, Alstad DN, Hutchison WD. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 93:26–30.



11. Andreadis SS, Alvarez-Alfageme F, Sánchez-Ramos I, Stodola TJ, Andow DA, Milonas PG, Savopoulou-Soultani M, Castánera P. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 100:195–201.
12. Anilkumar KJ, Rodrigo-Simón A, Ferré J, Pusztai-Carey M, Sivasupramaniam S, Moar WJ. 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Appl Environ Microbiol* 74:462–469.
13. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
14. Aramideh S, Safaralizadeh MH, Pourmirza AA, Rezazadeh M. 2010. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African J Microbiol Res* 4: 1224–1236.
15. Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem* 285:12497–12503.
16. Armada E, Probanza A, Roldán A, Azcón R. 2016. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *J Plant Physiol* 192:1–12.
17. Armada E, Azcón R, López-Castillo OM, Calvo-Polanco M, Ruiz-Lozano JM. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol Biochem PPB* 90:64–74.
18. Arrieta G, Espinoza AM. 2005. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. *Rev Biol Trop* 54:13–27.
19. Auh CK, Murphy TM. 1995. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-stimulated rose. *Cells Plant Physiol* 107:1241–1247.
20. Bach M, Schnitzler JP, Seitz HU. 1993. Elicitor-Induced Changes in Ca²⁺ Influx, K⁺ Efflux, and 4-Hydroxybenzoic Acid Synthesis in Protoplasts of *Daucus carota* L. *Plant Physiol* 103:407–412.

21. Baig DN, Mehnaz S. 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiol Res* 165:376–383.
22. Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension. *Cells Plant Physiol* 102:1341–1344.
23. Baranek J, Konecka E, Kaznowski A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *Biocontrol* (10):1–10.
24. Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE, Jacobsen BJ. 2003. Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1145–1153.
25. Barloy F, Lecadet MM, Delécluse A. 1998. Distribution of clostridial cry-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. *Curr Microbiol* 36:232–237.
26. Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287.
27. Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276–287.
28. Bel Y, Granero F, Alberola TM, Sebastian MJM, Ferre J. 1997. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Syst Appl Microbiol* 20:652–658.
29. Bel Y, Ferré J, Escriche B. 2011. Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *BMC Res Notes* 4:84.
30. Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, Manasherob R, Khamraev A, Troitskaya E, Dubitsky A, Berezina N, Margalith Y. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 63:4883–4890.
31. Bentur JS, Andow DA, Cohen MB, Romena AM, Gould F. 2000. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 93:1515–1521.
32. Bergamasco LCC, Nunes FLS. 2013. Applying Distance Histogram to retrieve 3D cardiac



- medical models. AMIA . Annu Symp proceedings AMIA Symp 2013:112–121.
33. Berón CM, Salerno GL. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51:779–794.
 34. Bhattacharya RK. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* 27:21–28.
 35. Bizzarri MF, Bishop AH. 2008. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microb Ecol* 56:133–139.
 36. Bizzarri MF, Bishop AH. 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *J Invertebr Pathol* 94:38–47.
 37. Blanco CA, Gould F, Vega-Aquino P, Jurat-Fuentes JL, Perera OP, Abel CA. 2009. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. *J Econ Entomol* 102:1599–1606.
 38. Bolwell GP, Bindschedler L V, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53:1367–1376.
 39. Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* 23:517–532.
 40. Boncheva R, Dukiandjiev S, Minkov I, de Maagd RA, Naimov S. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *J Invertebr Pathol* 92:96–99.
 41. Bottin A, Veronesi C, Pontier D, Esquerre-Tugaye MT, Blein JP, Rusterucci C, Ricci P. 1994. Differential responses of tobacco cells to elicitors from two Phytophthora species [cryptogein, defence induction, transduction pathway]. *Plant Physiol Biochem* 32:373–378.
 42. Bourguet D, Chaufaux J, Séguin M, Buisson C, Hinton JL, Stodola TJ, Porter P, Cronholm G, Buschman LL, Andow DA. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor Appl Genet* 106:1225–1233.
 43. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
44. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49 49:423–435.
 45. Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1667:38–46.
 46. Bravo A, I. G, H. P, BI. G-G, C. R-A, Pardo L, Soberón M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity *Microbial Biotechnology* . *Microb Biotechnol* 6:17–26.
 47. Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965–4972.
 48. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41:423–431.
 49. Bravo A, Soberón M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 26:573–579.
 50. Brent KJ. 1986. Detection and monitoring of resistant forms: an overview, p. 298–312. *In* National Research Council, (Ed.), *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Academy Press, Washington, DC.
 51. Broderick NA, Goodman RM, Handelsman J, Raffa KF. 2003. Effect of Host Diet and Insect Source on Synergy of Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by Zwittermi. *Environ Entomol* 32:387–391.
 52. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. 2007. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185–2194.
 53. Carmona D, Rodríguez-Almazán C, Muñoz-Garay C, Portugal L, Pérez C, de Maagd RA, Bakker P, Soberón M, Bravo A. 2011. Dominant negative phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins. *PLoS One* 6:e19952.



54. Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57:3057–3061.
55. Carillo P, Gibbon Y, 2011. Protocol: Extraction and Determination of Proline. Prometheus Wiki01/2011. http://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline.
56. Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J. 2016. Correction for Chakroun et al., Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:iii.
57. Charles JF, Nielsen-LeRoux C. 2000. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1:201–206.
58. Chen H, Zhang S, Zhen K, Wang X-F, Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2010. Relationship between the expression of occludin and tumor genesis and development in the gastric carcinoma. 26:1008–1011.
59. Chen XR, Wang XL, Zhang ZJ, Wang YC, Zheng XB. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 73:16e24.
60. Chen Y, Xu HS, Guo TL. 2018. Modulation of cytokine/chemokine production in human macrophages by bisphenol A: A comparison to analogues and interactions with genistein. *J Immunotoxicol* 15:96–103.
61. Chen Z, He F, Xiao Y, Liu C, Li J, Yang Y, Ai H, Peng J, Hong H, Liu K. 2015. Endogenous expression of a Bt toxin receptor in the Cry1Ac-susceptible insect cell line and its synergistic effect with cadherin on cytotoxicity of activated Cry1Ac. *Insect Biochem Mol Biol* 59:1–17.
62. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Entomocidus HD110. *Microbiol Res* 163:684–692.
63. Choi C, Sunwoo IN, Kim HS, Kim DI. 2000. Transient improvement of pyruvate metabolism after coenzyme Q therapy in Kearns-Sayre syndrome: MRS study. *Yonsei Med J* 41:676–679.
64. Choi JY, Lee JM, Lee JY, Kim SH, Lee MW, Han JK, Choi BI. 2007. Assessment of hilar and extrahepatic bile duct cancer using multidetector CT: value of adding

- multiplanar reformations to standard axial images. *Eur Radiol* 17:3130–3138.
65. Compant S, van der Heijden MGA, Sessitsch A. 2010. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73:197–214.
66. Constant CR. 1990. Injuries to the elbow. *J R Coll Surg Edinb* 35:S31-2.
67. Crava CM, Bel Y, Jakubowska AK, Ferré J, Escriche B. 2013. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 43:924–935.
68. Crava MC, Bel Y, Escriche B, Ehlers RU, Crickmore N. 2009. *Bacillus thuringiensis* susceptibility variation among *Ostrinia nubilalis* populations. *Insect Pathog Insect Parasit Nematodes IOBC/wprs Bull* 45:171–174.
69. Crow RS. 1960. Aortic incompetence in ankylosing spondylitis. *Br Med J* 2:271–273.
70. Damgaard PH. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment, p. 23–40. *In* Charles, J-F, Delécluse, A, Nielsen-LeRoux, C (eds.), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
71. Dammak M, Jaoua S, Tounsi S. 2011. Construction of a *Bacillus thuringiensis* genetically-engineered strain harbouring the secreted Cry1Ia delta-endotoxin in its crystal. *Biotechnol Lett* 33:2367–2372.
72. Davis D, Merida J, Legendre L, Low PS, Heinsteinst PF. 1993. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochem* 32:607–611.
73. Davis JA, Guertin J, Cottrell DM. 1993. Diffraction-free beams generated with programmable spatial light modulators. *Appl Opt* 32:6368–6370.
74. de Escudero I, Estela A, Escriche B, Caballero P. 2007. Ruiz and Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl Environ Microbiol* 73:337–340.
75. de Goes K, Fisher MLD, Cattelan AJ, Nogueira MA, de Carvalho CGP, M. AL, J. 2012. de Oliveira and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Biotechnol* 22: 437–447.
76. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17:193–199.

77. de Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W, Bosch D. 2000. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol* 66:1559–1563.
78. de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37:409–433.
79. de Souza JD, de Oliveira CM, Ayres CF, Jain S, Lucena WA. 2009. Antonino , Fontes , and . Toxicity of a *Bacillus thuringiensis* israelensis-like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl* 54: 467–473.
80. de NM, Casados-Vázquez LE, García-Pérez AP, Barboza-Pérez UE, Bideshi DK. 2016. The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeospo*. *Microbiologyopen* 5:819–829.
81. Deng J, Cui J, Jiang N, Zhang R, Zhang L, Hao X, Liang H. 2014. STAT3 regulation the expression of VEGF-D in HGC-27 gastric cancer cell. *Am J Transl Res* 6:756–767.
82. Devlin PF, Rood SB, Somers DE, Quail PH, Whitelam GC. 1992. Photophysiology of the Elongated Internode (ein) Mutant of *Brassica rapa*: ein Mutant Lacks a Detectable Phytochrome B-Like Polypeptide. *Plant Physiol* 100:1442–1447.
83. Devlin WS, Gustine DL. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 100:1189–1195.
84. Dimkpa C, Weinand T, Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682–1694.
85. Djenane Z, Nateche F, Amziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H, Ferré J. 2017. Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria. *Toxins (Basel)* 9.
86. Doke N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol* 23:359–367.
87. Doke N, Ohashi Y. 1988. Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol* 32:163–175.

88. Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nat* 411:813–817.
89. Dong Y, Zhang X, Xu J, Zhang L, H. 2004. H, F, L & *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Env Microbiol* 70: 954–960.
90. Dong Y-H, Zhang X-F, Xu J-L, Zhang L-H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* 70:954–960.
91. Dong Z, Cmarik JL. 2002. Harvesting cells under anchorage-independent cell transformation conditions for biochemical analyses. *Sci STKE* 2002:pl7.
92. Dong-Jun S, Nguyen DMC, Song YS, Jung WJ. 2012. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J Microbiol Biotechnol* 22:407–415.
93. Downes K, Pekalski M, Angus KL, Hardy M, Nutland S, Smyth DJ, Walker NM, Wallace C, Todd JA. 2010. Reduced expression of IFIH1 is protective for type 1 diabetes. *PLoS One* 5.
94. Downes S, Parker TL, Mahon RJ. 2010. Characteristics of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) isolated from a field population. *J Econ Entomol* 103:2147–2154.
95. Dreywood R. 1946. Qualitative test for earbohydrate material. *Ind attd Eng Chem Ed* 18: 499.
96. Driss F, Kallassy-Awad M, Zouari N, Jaoua S. 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol* 99:945–953.
97. Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd Allah EF, Hashem A. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol* 8:2104.
98. Escriche B, Bel Y. 1995. Ferré J, Van Rie and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Lett* 132:1–7.
99. Escriche B, Silva FJ, Ferr, Eacute J. 1995. Testing Suitability of Brush Border Membrane Vesicles Prepared from Whole Larvae from Small Insects for Binding Studies with



- Bacillus thuringiensis* CryIA. J Invertebr Pathol 65:318–320.
100. Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. J Biol Chem 284:18401–18410.
101. Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME. 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. Mol Plant Microbe Interact 17:343–350.
102. Fang S, Wang L, Guo W, Zhang X, Peng D, Luo C, Yu Z, Sun M. 2009. *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. Appl Environ Microbiol 75:5237–5243.
103. Farinós GP, de la Poza M, Poza M, Crespo P, Ortego F, Castañera P. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. Entomol Exp Appl 110:23–30.
104. Federici BA. 1991. Microbial insecticides. Pestic Outlook 2:22–28.
105. Federici BA, Park HW, Sakano Y. 2006. Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis*, p. 195–236. In Shively, JM (ed.), Microbiology Monographs.
106. Ferrandis MD, Frutos R, Bel Y. 1999. Juárez-Pérez VM, Ferré of cryI, cryII and crywith in *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. Syst Appl Microbiol 22:179–185.
107. Ferré J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 88:5119–5123.
108. Ferre J, Rie J. 2002. Van Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol 47 :501–533.
109. Fischer R, Schliess F, Häussinger D. 1997. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca²⁺ response in cultured rat astrocytes. Glia 20:51–58.
110. Flores-Cruz Z, Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. Mol Plant Microbe Interact 22:773–782.
111. Foyer CH, Descourvie'res P, Kunert KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell Environ 17:507–523.
112. Fu Z, Sun Y, Xia L, Ding X, Mo X, Li X, Huang K, Zhang Y. 2008. Assessment of protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* strains by use of polyacrylamide gel block

and mass spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:875–880.

113. Fuente-Salcio N, Alanís-Guzmán MG, Bideshi DK, SalcedoHernández R, Bautista-Justo M, Barboza-Corona JE. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 190:633–640.
114. Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet* e1001248.
115. Garay C, Saab-Rincon G, Damian-Almazo JY, Gill SS, Bravo A. 2007. Jiménez-Juárez N, Muñoz Gómez I, Soberón M. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants Affect oligomer Form are nontoxic to *Manduca sexta* larvae *J Biol Chem* 282:21222–21229.
116. Garay J. 2009. Cooperation in defence against a predator. *J Theor Biol* 257:45–51.
117. Garay M, Bollo J, Balague C, Targarona E, Trias M. 2014. Gastrointestinal bleeding as a first symptom of a focal jejunal amyloidosis. *Cir Esp* 92:696–698.
118. García-Suárez R, Verduzco-Rosas LA, Rincon-Castro MC, Delano-Frier JP, Ibarra JE. 2017. And . Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. *J Appl Microbiol* 122:1092–1100.
119. Gelernter, W D. FB. 1986. Federici cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*. *J Invertebr Pathol* 48:199–207.
120. Glazener JA, Orlandi EW, Baker CJ. 1996. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* 110:759–763.
121. Goma EZ. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol* 50:103–111.
122. Gomez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 513:242–246.
123. Gomis-Cebolla J, Ruiz de Escudero I, Vera-Velasco NM, Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Ceballos T, Palma L, Escriche B, Caballero P, Ferré J. 2017. Insecticidal spectrum and mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Ca insecticidal protein. *J Invertebr Pathol* 142:60–67.

124. Gomis-Cebolla J, Wang Y, Quan Y, He K, Walsh T, James B, Downes S, Kain W, Wang P, Leonard K, Morgan T, Oppert B, Ferré J. 2018. Analysis of cross-resistance to Vip3 proteins in eight insect colonies, from four insect species, selected for resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 155:64–70.
125. Goodman CL, Wang AA, Nabli H, McIntosh AH, Wittmeyer JL, Grasela JJ. 2004. Development and partial characterization of heliothine cell lines from embryonic and differentiated tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40:89–94.
126. Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3519–3523.
127. Granados V, Ichazo S, Chávez J, Zamora J, Ochoa C, Cardoso G, Posadas C. 1994. [Fasting and postprandial lipids and lipoproteins during the chronic administration of antihypertensive drugs]. *Arch Inst Cardiol Mex* 64:469–475.
128. Grene R. 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants, p. . *In* Somerville, CR, Meyerowitz, ER (eds.), *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
129. Griffitts JS, Aroian R V. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27:614–624.
130. Gringorten JL, Sohi SS, Masson L. 1999. Activity spectra of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:299–303.
131. Grishechkina SD, Ovkandybin NVS. 2002. Fungistatic activity of different *Bacillus thuringiensis* subspecies [Russian]. *Микология и фитопатология* 36:58–62.
132. Grossi-De-Sa MF, Quezado dMM, Silva MS, Silva SM, Dias SC. 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem Mol Biol* 40.
133. Groulx N, McGuire H, Laprade R, Schwartz J-L, Blunck R. 2011. Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J Biol Chem* 286:42274–42282.
134. Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein CP. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Env Microbiol* 67:1090–1096.
135. Guo C-H, Zhao S-T, Ma Y, Hu J-J, Han X-J, Chen J, Lu M-Z. 2012. *Bacillus thuringiensis*

- Cry3Aa fused to a cellulase-binding peptide shows increased toxicity against the longhorned beetle. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1249–1256.
136. Guo SY, Zhang CL, Lin XY, Zhang YR, He KL, Song FP, Zhang J. 2011. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Protein Expr Purif* 78:204–208.
137. Guo S, Zhang Y, Song F, Zhang J, Huang D. 2009. Protease-resistant core form of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie: monomeric and oligomeric forms in solution. *Biotechnol Lett* 31:1769–1774.
138. Hara H, Atsumi S, Yaoi K, Nakanishi K, Higurashi S, Miura N, Tabunoki H, Sato R. 2003. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. *FEBS Lett* 538:29–34.
139. He XZ, Wang Q, Xu J. 2007. Influence of larval density on biological fitness of *Ephestia kuehniela* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *New Zeal Plant Prot* 60:199–202.
140. Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto AB. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66:2627–2630.
141. Hernández CS, Andrew R, Bel Y, Ferré J. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J Invertebr Pathol* 88:8–16.
142. Hernández CS, Martínez C, Porcar M, Caballero P, Ferré J. 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. *J Invertebr Pathol* 82:57–62.
143. Hernández-Martínez P, Vera-Velasco NM, Martínez-Solís M, Ghislain M, Ferré J, Escriche B. 2014. Shared binding sites for the *Bacillus thuringiensis* proteins Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa in the African sweet potato pest *Cylas puncticollis* (Brentidae). *Appl Environ Microbiol* 80:7545–7550.
144. Hernandez-Rodriguez CS, Boets A, Rie J, Ferre J. 2009. Van and Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Microbiol* 107:219–225.
145. Herrero S, González-Cabrera J, Ferré J, Bakker PL, de Maagd RA. 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J* 384:507–513.
146. Hofte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.



- Microbiol Rev 53:242–255.
147. Hollensteiner M, Augat P, Furst D, Esterer B, Gabauer S, Puschel K, Schrodfl F, Schrempf A. 2017. Novel synthetic vertebrae provide realistic haptics for pedicle screw placement. Conf Proc . Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf 2017:46–49.
148. Huang X. 2009. An improved test of latent-variable model misspecification in structural measurement error models for group testing data. Stat Med 28:3316–3327.
149. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. Bioeng Bugs 1:31–50.
150. J. L-D, PE. C, SS. G, M. S, A. B. 2013. Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae . Env Microbiol 15:3030–3039.
151. Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar. 2012. Anti-oxidant modulation in response to gamma radiation induced oxidative stress in developing seedlings of *Psoralea corylifolia* L. J Environ Radioact 113:142–149.
152. Jayaraj J, Yi H, Liang GH, Muthukrishnan S, Velazhahan R. 2004. Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanz. 111:115–125.
153. Jouzani GS, Abad AP, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. J Ind Microbiol Biotechnol 35:83–94.
154. Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Appl Microbiol Biotechnol 101:2691–2711.
155. Juárez-Pérez VM, Ferrandis MD, Frutos R. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. Appl Environ Microbiol 63:2997–3002.
156. Jung YC, Mizuki E, Akao T, Côté JC. 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. J Appl Microbiol 103:65–79.
157. Kamenek LK, Kamenek D V, Terpilowski MA, Gouli V V. 2012. Antifungal action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin against pathogenic fungi related to *Phytophthora* and *Fusarium*. J Agric Technol 8:191–203.

158. Kar M, Mishra D. 1975. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315–319.
159. Kelley NJ, Schmeichel BJ. 2015. Thinking about Death Reduces Delay Discounting. *PLoS One* 10:e0144228.
160. Keshavarzi M. 2008. Isolation, identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. *J Agric Sci* 10: 493–499.
161. Khomkhum N, Leetachewa S, Angsuthanasombat C, Moonsom S. 2015. Functional assembly of 260-kDa oligomers required for mosquito-larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Peptides* 68:183–189.
162. Khorramnejad A, Bel Y, Hernández-Martínez P, Talaei-Hassanloui R, Escriche B. 2018. Insecticidal activity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia protein. *GMOs Integr Plant Prot IOBC-WPRS Bull* 131:56–63.
163. Kim K, Lee YH, Kwon H, Kim JM, Kim IS, Park YK. 2004. Averaging algorithm based on data statistics in magnetocardiography. *Neurol Clin Neurophysiol* 2004:42.
164. Kleter GA, Bhula R, Bodnaruk K, Carazo E, Felsot AS, Harris CA, Katayama A, Kuiper HA, Racke KD, Rubin B, Shevah Y, Stephenson GR, Tanaka K, Unsworth J, Wauchope RD, Wong S-S. 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. *Pest Manag Sci* 63:1107–1115.
165. Knaak A.A.; Fiuza, L.M N. R. 2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz J Microbiol* 38:526–530.
166. Knowles BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Adv In Insect Phys* 24:275–308.
167. Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T, Shibuya N. 1995. EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188:138–142.
168. Kwa MS, de Maagd RA, Stiekema WJ, Vlak JM, Bosch D. 1998. Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C to cultured insect cells. *J Invertebr Pathol* 71:121–127.
169. Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251e275.
170. Lambert B, Peferoen M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. *Biosci - Am Inst Biol S.* 42:112–122.



171. Lecadet MM, Frachon E, Dumanoir VC, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thiéry I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 86:660–672.
172. Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. 2002. Genes encoding the N-acetyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 68:3919–3924.
173. Lenina NK, Naveenkumar A, Sozhavendan AE, Balakrishnan N, Balasubramani V, Udayasuriyan V. 2014. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol* 4:545–551.
174. Letourneau DK, Robinson GS, Hagen JA. 2003. Bt crops: predicting effects of escaped transgenes on the fitness of wild plants and their herbivores. *Environ Biosafety Res* 2:219–246.
175. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583–593.
176. Li A, Daggett V. 1996. Identification and characterization of the unfolding transition state of chymotrypsin inhibitor 2 by molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* 257:412–429.
177. Li DH-H, Winslow MM, Cao TM, Chen AH, Davis CR, Mellins ED, Utz PJ, Crabtree GR, Parnes JR. 2008. Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model. *Arthritis Rheum* 58:3192–3204.
178. Li JD, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815–821.
179. Li X, Ding X, Xia L, Sun Y, Yuan C, Yin J. 2012. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 at different growth phases. *Sci World J* 10.
180. Li X, Zhao F, Qiu X, Ren X, Mo X, Ding X, Xia L, Sun Y. 2018. The full-length Cry1Ac protoxin without proteolytic activation exhibits toxicity against insect cell line CF-203. *J Invertebr Pathol* 152:25–29.
181. Li Y, Zhang J, Zheng G, Sun Y, Hong SS, Xiong F, Wang S, Lee HR, Cui Y. 2015. Lateral and vertical two-dimensional layered topological insulator heterostructures. *ACS Nano* 9:10916–10921.
182. Likitvivatanavong S, Katzenmeier G, Andsuthanasombat C. 2005. Asn183 in $\alpha 5$ is essential for oligomerization and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch Biochem Biophys* 445:46–55.

183. Lindner WA, Hoffman C, Grisebach H. 1988. Rapid elicitor-induced chemiluminescence in soybean cell suspension cultures. *Phytochem* 27:2501–2503.
184. Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. 2014. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins (Basel)* 6:2229–2238.
185. Liu XS, Dean DH. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng Des Sel* 19:107–111.
186. Liu Y, Zhang X, Xue Z, Sheng J. 2010. Dibutyl 5-[(4-ethoxycarbonylphenyl)diazenyl]benzene-1,3-dicarboxylate. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online* 66:o1730.
187. Lozzia GC, Manachini B. 2003. Susceptibility of *Ostrinia nubilalis* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Bull Insectology* 56:215–219.
188. Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Lindow S, Orduz S. 2007. Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. *J Appl Microbiol* 103:2593–2600.
189. Mahon RJ, Downes SJ, James B. 2012. Vip3A resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin. *PLoS One* 7:e39192.
190. Mandal CC, Gayen S, Basu A, Ghosh KS, Dasgupta S, Maiti MK, Sen SK. 2007. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. *Protein Eng Des Sel* 20:599–606.
191. Martínez C, Oguiza JA, Porcar M, Ruiz del Estal A. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 72:4796–4804.
192. Martínez C, Porcar M, López A, Ruiz de Escudero I, Pérez-Llarena FJ, Caballero P. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol Exp Appl* 111:71–77.
193. Martínez P, Escriche B. 2008. Hernández-Ferré, J., and Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 97:245–250.
194. Martins ES, Aguiar RWDS, Martins NF, Melatti VM, Falcão R, Gomes ACM, Ribeiro BM, Monnerat RG. 2008. Recombinant cryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J. Appl.*



- Microbiol. 104. J Appl Microbiol 104:1363–1371.
195. May MJ, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Involvement of Reactive Oxygen Species, Glutathione Metabolism, and Lipid Peroxidation in the Cf-Gene-Dependent Defense Response of Tomato Cotyledons Induced by Race-Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum*. Plant Physiol 110:1367–1379.
196. McConnell E, Richards AG. 1959. The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects. Can J Microbiol 5:161–168.
197. Mcgaughey WH, Beeman RW. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colonies of Indianmeal Moth and Almond Moth (Lepidoptera: Pyralidae). J Econ Entomol 81:28–33.
198. Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7:405e410.
199. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. J Appl Microbiol 86:477–486.
200. Mohammad AM, El-Fatih MM, Helmy KG. 2013. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* strains and their efficacy against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. Arch Phytopathol Plant Prot 46:2420–2427.
201. Monnerat R, Martins E, Praça L, Dumas V, Berry C. 2012. Activity of a Brazilian strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against the cotton Boll Weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotrop Entomol 41:62–67.
202. Monnerat RG, Soares CM, Capdeville G, Jones G, Martins ES, Praça L, Cordeiro BA, Braz SV, dos Santos RC, Berry C. 2009. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. Microb Biotechnol 2:512–520.
203. Nair MS, Dean DH. 2015. Composition of the Putative Prepore Complex of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. Adv Biol Chem 5:179–188.
204. Nazarian A, Jahangiri R, Jouzani GS, Seifinejad A, Soheilvand S, Bagheri O, Keshavarzi M, Alamisaieid K. 2009. Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. J Invertebr Pathol 102:101–109.
205. Nurnberger T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D. 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. Cell 78:449–460.
206. Ocelotl J, Sánchez J, Arroyo R, García-Gómez BI, Gómez I, Unnithan GC, Tabashnik

- BE, Bravo A, Soberón M. 2015. Binding and Oligomerization of Modified and Native Bt Toxins in Resistant and Susceptible Pink Bollworm. PLoS One 10:e0144086.
207. Ocelotl J, Sánchez J, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, Soberón M. 2017. ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. Sci Rep 7:2386.
208. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res 29:427–433.
209. Oliveira RSD, Oliveiraneto OB, Moura HFN, Macedo L, Arraes FBM. 2016. Transgenic Cotton Plants Expressing Cry1Ia12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). Front Plant Sci 7.
210. Onofre J, Gaytán MO, Peña-Cardena A, García-Gomez BI, Pacheco S, Gómez I, Bravo A, Soberón M. 2017. Identification of Aminopeptidase-N2 as a Cry2Ab binding protein in *Manduca sexta*. Peptides 98:93–98.
211. Orlova M V, Smirnova TA, Ganushkina LA, Yacubovich VY, Azizbekyan RR. 1998. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. Appl Environ Microbiol 64:2723–2725.
212. Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodríguez-Almazán C, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. J Biol Chem 284:32750–32757.
213. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins (Basel) 6:3296–3325.
214. Palma L, Scott DJ, Harris G, Din S-U, Williams TL, Roberts OJ, Young MT, Caballero P, Berry C. 2017. The Vip3Ag4 Insecticidal Protoxin from *Bacillus thuringiensis* Adopts A Tetrameric Configuration That Is Maintained on Proteolysis. Toxins (Basel) 9.
215. Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A, Fems. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. Reviews 37: 3–22.
216. Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev 37:3–22.
217. Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog



- Biophys Mol Biol 88:91–142.
218. Pérez C, Muñoz-Garay C, L. P, Sánchez J, Gill SS, Soberón M, Bravo A. 2007. *Bacillus thuringiensis* spp. Israelensis Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Cell Microbiol 9:2931–2937.
219. Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA. 1990. Insect resistant cotton plants. Nat Biotechnol 8:939–943.
220. Pérombelon MCM. 1992. The genus *Erwinia*, p. 2899– 2921. In Truper, HG, Dworkin, M, Harder, W, Schleifer, KH (eds.), The prokaryotes second. Springer Berlin Heidelberg, New York.
221. Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol Rev 71:255–281.
222. Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutat Res 247:57–64.
223. Porcar M, Caballero P. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. J Appl Microbiol 89:309–316.
224. Portugal L, Gringorten JL, Caputo GF, Soberón M, Muñoz-Garay C, Bravo A. 2014. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. Peptides 53:292–299.
225. Portugal L, Muñoz-Garay C, Martínez de Castro DL, Soberón M, Bravo A. 2017. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. Insect Biochem Mol Biol 80:21–31.
226. Priest FG. 2000. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria, p. 1–22. In Charles, JF, Delecluse, A, Nielsen-Leroux, C (eds.), Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
227. Rajamohan F, Hussain SR, Cotrill JA, Gould F, Dean DH. 1996. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. J Biol Chem 271:25220–25226.
228. anieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants

exposed to ozone. *J Exp Bot* 54:2529–2540.

229. Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, Bravo A. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim Biophys Acta* 1660:99–105.
230. Rausell C, Muñoz-Garay C, Miranda-Casso Luengo R, Gómez I, Rudiño-Piñera E, Soberón M, Bravo A. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 43:166–174.
231. Revina LP, Kostina LI, Dronina MA, Zalunin IA, Chestukhina GG, Yudina TG, Konukhova A V, Izumrudova A V. 2005. Novel antibacterial proteins from entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Can J Microbiol* 51:141–148.
232. Rodríguez-Almazán C, Zavala LE, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Pacheco S, Masson L, Soberón M, Bravo A. 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.
233. Ruiz de Escudero, Estela A, Porcar M, Martínez C, Oguiza JA. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 72:4796–4804.
234. Sadfi N, Chérif M, Fliss I, Boudabbous A, Antoun H. 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of fusarium dry rot of potato tubers. *J Plant Pathol* 83:101–117.
235. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9:283–300.
236. Sayyed AH, Gatsi R, Ibiza-Palacios MS, Escriche B, Wright DJ, Crickmore N. 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl Environ Microbiol* 71:6863–6869.
237. Scaramal Ricietto AN, Gomis-Cebolla J, Vilas-Boas GT, Ferré J. 2016. Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. *J Invertebr Pathol* 141:1–5.
238. Schaller A. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer Science.



239. Schenepf E, Crickmore N, Rie J V, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Am Soc Microbiol 62: 775–806.
240. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62:775–806.
241. Seifinejad A, Jouzani GR, Hosseinzadeh A, Abdmishani C. 2007. Salehi , and Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biol Control 44: 216–226.
242. Shakir SK, Irfan S, Akhtar B, Rehman SU, Daud MK. 2018. Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. Ecotoxicology (9):1–17.
243. Shrestha P, Mohan S, Roy S. 2015. Bug on the back: vertebral osteomyelitis secondary to fluoroquinolone resistant *Salmonella typhi* in an immunocompetent patient. BMJ Case Rep 2015.
244. Siegfried BD, Rangasamy M, Wang H, Spencer T, Haridas C V, Tenhumberg B, Sumerford D V, Storer NP. 2014. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Pest Manag Sci 70:725–733.
245. Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, Handelsman J, He H, Clardy J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl Environ Microbiol 60:2023–2030.
246. Sivasupramaniam S, Head GP, English L, Li YJ, Vaughn TT. 2007. A global approach to resistance monitoring. J Invertebr Pathol 95:224–226.
247. Smagghe G, Goodman CL, Stanley D. 2009. Insect cell culture and applications to research and pest management. In Vitro Cell Dev Biol Anim 45:93–105.
248. Soberon M, Gill SS, Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? . Cell Mol Life Sci 66:1337–1349.
249. Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. Toxicon 49:597–600.
250. Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. Science 318:1640–1642.

251. Song F, Zhang J, Gu A, Wu Y, Han L, He K, Chen Z, Yao J, Hu Y, Li G, Huang D. 2003. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. *Appl Env Microbiol* 69:5207–5211.
252. Stewart GS, Johnstone K, Hagelberg E, Ellar DJ. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem J* 198:101–106.
253. Stodola TJ, Andow DA, Hyden AR, Hinton JL, Roark JJ, Buschman LL, Porter P, Cronholm GB. 2006. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States Corn Belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 99:502–507.
254. Sun Y, Fu Z, Ding X, Xia L. 2008. Evaluating the insecticidal genes and their expressed products in *Bacillus thuringiensis* strains by combining PCR with mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74:6811–6813.
255. Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol* 31:510–521.
256. Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol* 26:199–202.
257. Tabashnik BE, Liu Y-B, Dennehy TJ, Sims MA, Sisterson MS, Biggs RW, Carrière Y. 2002. Inheritance of resistance to Bt toxin cryIac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol* 95:1018–1026.
258. Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J Econ Entomol* 107:496–507.
259. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick JA, Wu Y, Gao M, Huang F, Wei J, Zhang J, Yelich A, Unnithan GC, Bravo A, Soberón M, Carrière Y, Li X. 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci Rep* 5:15107.
260. Tailor R, Tippett J, Gibb G, Pells S, Pike D, Jordan L, Ely S. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol* 6:1211–1217.
261. Tanaka S, Endo H, Adegawa S, Kikuta S, Sato R. 2016. Functional characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors explains resistance in insects. *FEBS J* 283:4474–4490.
262. Thammasittirong A, Attathom T. 2008. PCR-based method for the detection of cry genes

- in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *J Invertebr Pathol* 98:121–126.
263. Thiery I, Frachon E. 1997. Bacteria: identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, p. 55–75. *In* Lacey, LA (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London.
264. Thilagavathi R, Saravanakumar D, Ragupathi N, Samiyappan R. 2007. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathol Mediterr* 46:157–167.
265. Tingué N, Jacoby J, Ellar DJ. 2001. The α -helix residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* 67:5715–5720.
266. Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A. 2006. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:22–32.
267. Travers RS, Martin PA, Reichelderfer CF. 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 53:1263–1266.
268. Trovato M, Mattioli R, Costantino P. 2008. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rend Lincei* 19: 325–346.
269. Uribe D, Martinez W, Cerón J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 82:119–127.
270. Vachon V, Laprade R, Schwartz J-L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol* 111:1–12.
271. van Frankenhuyzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101:1–16.
272. Vardharajula S, Ali SZ, Grover M, Reddy G, Bandi V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact* 6:1–14.
273. Vargas RI, Miyashita D, Nishida T. 1984. Life History and Demographic Parameters of Three Laboratory-reared Tephritids (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 77:651–656.
274. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two

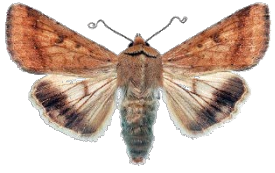
- cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213–217.
275. Vega FE, Kaya HK, Tanada Y. 2012. *Insect Pathology*. Second edition. Academic Press, . San Diego, CA. 496p.
276. Vera-Estrella R, Blumwald E, Higgins VJ. 1992. Effect of Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum* on Tomato Suspension Cells: Evidence for the Involvement of Active Oxygen Species. *Plant Physiol* 99:1208–1215.
277. Vidal-Quist JC, Rogers HJ, Mahenthiralingam E, Berry C. 2013. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. *FEMS Microbiol Ecol* 86:474–489.
278. Vinoj G, Vaseeharan B, Thomas S, Spiers AJ, Shanthi S. 2014. Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Mar Biotechnol (NY)* 16:707–715.
279. Wang WJ, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. 2006. And . Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15:351–358.
280. Wang X, Li X, Shen A, Wu Y. 2010. Baseline susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. *J Econ Entomol* 103:843–848.
281. Wang Y, Yi L, Zhang Z, Fan H, Cheng X, Lu C. 2013. Overexpression of luxS cannot increase autoinducer-2 production, only affect the growth and biofilm formation in *Streptococcus suis*. *ScientificWorldJournal* :924276.
282. Willcoxon MI, Dennis JR, Lau SI, Xie W, You Y, Leng S, Fong RC, Yamamoto T. 2016. A high-throughput, in-vitro assay for *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J Biotechnol* 217:72–81.
283. Witt DP, Carson H, Hodgdon JC .1986. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to cultured Cf-1 cells does not correlate with *in vivo* activity towards spruce budworm larvae. In “Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology” (Samson RA, Vlcek JM, Peters D, Eds.), pp. 3–6. Society for Invertebrate Pathology, San Diego, CA.
284. Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early response to pathogen infection. *Biochem J*



- 322:681e692.
285. Wolfersberger MG, Luthy P, Parenti P, Sacchi VF, Giordana B, Hanozet GM, A. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). . Comp Biochem Physiol A Physiol 86:301–308.
286. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH. 2000. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. FEBS Lett 473:227–232.
287. Wu Y. 2014. Detection and Mechanisms of Resistance Evolved in Insects to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. Adv In Insect Phys 47: 297–342.
288. Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. Toxins 6:2732–2770.
289. Yang P, Zhang L, Shi Q-J, Lu Y-B, Wu M, Wei E-Q, Zhang W-P. 2015. Nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor APO866 induces C6 glioblastoma cell death via autophagy. Pharmazie 70:650–655.
290. Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, Mizuki E, Yu YM, Ohba M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. Can J Microbiol 52:365–372.
291. Yilmaz E, Sezen H, Suzer S. 2012. Probing the charge build-up and dissipation on thin PMMA film surfaces at the molecular level by XPS. Angew Chem Int Ed Engl 51:5488–5492.
292. Yudina, L B. BL. 1997. Activity of d-endotoxin of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against prokaryotes. Microbiology 66:17–22.
293. Yudina TG, Konukhova A V, Revina LP, Kostina LI, Zalunin IA, Chestukhina GG. 2003. Antibacterial activity of Cry- and Cyt-proteins from *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis. Can J Microbiol 49:37–44.
294. Zhang CX, Hsieh T-S. 2007. Preparation of membrane proteins from *Drosophila embryos*. CSH Protoc 2007:pdb.prot4711.
295. Zhang H, Wu S, Yang Y, Tabashnik BE, Wu Y. 2012. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. PLoS One 7:e53418.
296. Zhang H, Tang M, Yang F, Yang Y, Wu Y. 2013. DNA-based screening for an

intracellular cadherin mutation conferring non-recessive Cry1Ac resistance in field populations of *Helicoverpa armigera*. *Pestic Biochem Physiol* 107:148–152.

297. Zhang H, Chen Q, Chen L-W, Cao H, Zhang G-C, Chen D-Z. 2011. Intraoperative device closure of atrial septal defects in the older population. *J Cardiothorac Surg* 6:123.
298. Zhang J-M, Zhu W, Zhang Y, Xiao D, Yao Y. 2012. Tailoring magnetic doping in the topological insulator Bi₂Se₃. *Phys Rev Lett* 109:266405.
299. Zhang Y, Wang F, Fang L, Wang S, Fang G. 2009. Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects. *J Biomed Biotechnol* 2009:579175.
300. Zhao C, Jurat-Fuentes JL, Abdelgaffar HM, Pan H, Song F, Zhang J. 2015. Identification of a New cry1I-Type Gene as a Candidate for Gene Pyramiding in Corn To Control *Ostrinia* Species Larvae. *Appl Environ Microbiol* 81:3699–3705.
301. Zhao J-Z, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat Biotechnol* 21:1493–1497.
302. Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu Y. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 40:113–118.
303. Zheng L-S, Ishii Y, Zhao Q-L, Kondo T, Sasahara M. 2013. PDGF suppresses oxidative stress induced Ca²⁺ overload and calpain activation in neurons. *Oxid Med Cell Longev* 2013:367206.
304. Zhou J, Chang S, Metaxas D, Mageras G. 2008. 3D-3D tubular organs registration based on bifurcations for the CT images. *Conf Proc . Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf* 2008:5394–5397.



PhD
Dissertation