تقييم كفاءة العزلات المحلية 28 للبكتريا *Bacillus thuringiensis* مع عزلة قياسية *B.t. Kurstaki* على يرقات حشرة عثة التمور *Ephestia cautella* مع اجراء التصنيف الجيني للعزلات المنتخبة

علي ستار جابر الوائلي جاسر محمد جميل

جامعة الفرات الاوسط التقنية, الكلية التقنية - المسيب

Alisattar159@gmail.com

ARTICLE INFO
Submission date:3/5/2018
Acceptance date:14/8/2018
Publication date:14/10/2018

الخلاصة

تضمنت الدراسة اختبار 28 عزلة محلية مع العزلة القياسية *B.t.Kurstaki*، أظهر التحليل الإحصائي لنتائج التقييم الحيوي على يرقات حشرة الأفستيا *Ephestia cautella* ان العزلة القياسية *B.t.kurstaki* اعطت نتائج قتل عالية جداً بلغت 100% بالتركيز الأول 1.2× 10^6بوغ/غم بعد عشرة ايام من المعاملة متفوقة على كافة العزلات جاءت بعدها العزلة IN-1 والتي أعطت نتيجة قتل بلغت 90 % بالتركيز 1.2× 10^6بوغ/غم وتليها العزلة NJ-1 اذ اعطت قتل 73.3% بالتركيز 1.2× 10^6بوغ/غم. اما عند اجراء التشخيص الجيني للعزلات القياسية والعزلات المنتخبة باستخدام خمس جينات Cry1,Cry2, Cry3, Cry4, Cry9, كان الجين Cry1 موجوداً في العزلة القياسية *B.t.kurstaki* والعزلة المحلية NJ-1 حيث كان حجم الجين 260–280 bp وتبين ان العزلة NJ-1 تعود للضرب *B.t.kurstaki*. اما عند استخدام الجين Cry9 اذ تم الحصول على هذا الجين في عزلة محلية IN-1 ولم يتم الحصول على هذا الجين في باقي العزلات اذ كان حجم الجين 345–360bp وتبين ان هذه العزلة ترجع للضرب *B.t.aizawai*.

الكلمات الدالة: عزلة محلية، جين، *Bacillus thuringiens* ، *Ephestia cautella*

Evaluation of the Efficacy of Local Isolates 28 Bacteria *Bacillus thuringiensis* with Standard Isolation *B.t. Kurstaki* on *Ephestia cautella* with the Genetic Classification of Selected Isolates

Ali J. sattar Al-Waily **Jasser M. Jamil**

Al-Furat Al-Awsat Technical University, Al-Mussaib Technical College

Alisattar159@gmail.com

Abstract

The study included 28 local isolates with standard isolation *B.t.kurstaki.* The statistical analysis of the results of bio-evaluation on the *Ephestia cautella* larvae showed that the standard isolation *B.t.kurstaki* gave very high killing results of 100% at the first concentration of 1.2 × 10^6 spor / g after ten days of treatment superior to All isolates were followed by isolation of IN-1, which resulted in a 90% kill with a concentration of 1.2 × 10^6 spor / g followed by isolation of NJ-1, killing 73.3% at a concentration of 1.2 × 10^6 spor / g. Cry1 was found in the standard isolation *B.t.kurstaki* and the local isolation NJ-1, where the size of the gene was 260-280bp. The isolation of the NJ-1 was found to be serovar *B.t.kurstaki*. When we used the Cry9 gene, we obtained this gene in local isolation, IN-1, and we did not obtain this gene in the other isolates, as the size of the gene was 345-360 bp, and it was shown that the isolation was serovar *B.t.aizawai*.

Keywords: local isolates, gene, *Bacillus thuringiensis*, *Ephestia cautella*

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBES) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

1- المقدمة

تعد الحشرات من اكثر مجاميع الكائنات الحية انتشاراً في الكرة الأرضية وهي تؤثر على حياة الانسان بطرق مختلفة ومتنوعة إذ إنها تسبب خسائر كبيرة في المحاصيل وكذلك تكون عاملاً ناقلاً للأمراض البشرية والحيوانية كالملاريا والحمى الصفراء **[1]**. ومع زيادة التعداد السكاني ازدادت الحاجة لمجابهة الحشرات والسيطرة على الفقد الذي تحدثة والذي يصل في المتوسط على مستوى العالم الى 43% في المقابل 13% على مستوى امريكا مع المحاصيل التي يستهلكها الانسان وهي قيمة عالية **[2]**. وهذا ما دفع الانسان الى مكافحة الحشرات ونتيجة لتطور العلم في مجال الكيمياء, تم البدء باستعمال المواد الكيميائية في مكافحة الآفات في اواسط عام 1800م **[3]** . وان استخدام منتجات المسببات الممرضة من بكتريا وفطريات وبعض الاحياء مثل ركتيسيا وابتدائيات والديدان الثعبانية في مقاومة الآفات يعرف بالمقاومة الجرثومية والتي بدا العمل بها في منتصف القرن الماضي**[4]**. ومن بين الجميع تعد بكتريا *Bacillus thuringiensis* هي اكثر الاحياء المجهرية اهمية لفعاليتها الحيوية العالية في مكافحة الآفات اذ ان البكتريا *Bacillus thuringiensis* بكتريا ممرضة قادرة على اصابة الابتدائيات والنيماتودا والديدان المسطحة والحلم والحشرات وهي كائنات اما ان تكون افات محاصيل او مسببات ممرضة للإنسان والحيوان **[5]**.

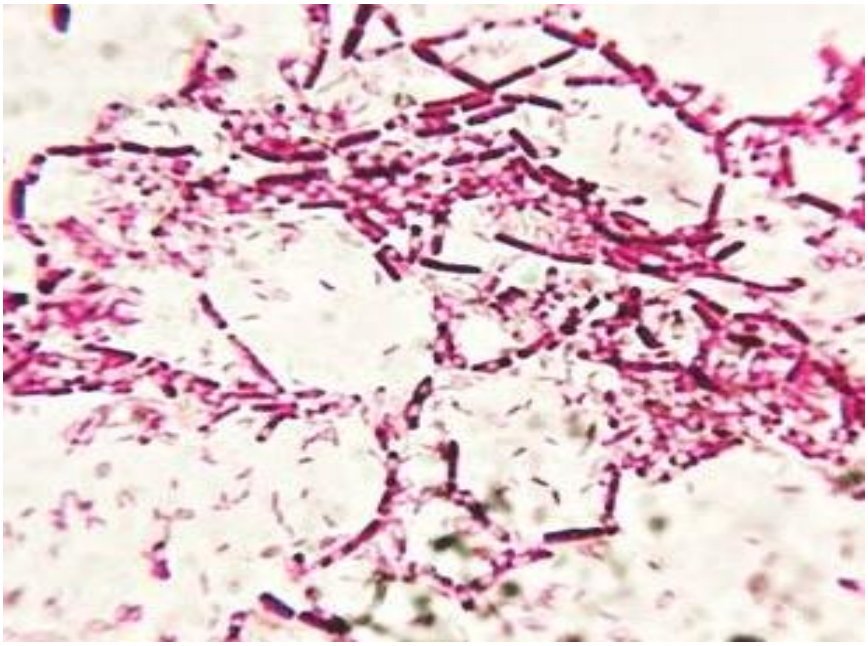
2- اهداف البحث

1. تشخيص البكتريا تشخيص اولي (مجهري) بالاعتماد على شكل البلورة او الكريستال الذي تنتجه.
2. اجراء اختبار حيوي للعزلات البكتيرية المحلية بحسب السم البلوري على حرشفية الأجنحة حشرة عثة التمور *Ephestia cautella*.
3. لتأكيد التصنيف المظهري نلجأ الى التصنيف الجيني باستخدام تقنية PCR لعزلات البكتريا *B. thuringiensis* التي اثبتت كفاءة على حشرة الأفستيا *Ephestia cautella*.

3- المواد وطرائق العمل

3.1 التشخيص والتوصيف المظهري للعزلات.

بعد حضن العزلات لمدة 72 ساعة حددت المستعمرات البكتيرية المستقلة والتي يعتقد ان مواصفاتها تتطابق مع مواصفات مستعمرات النوع *thuringiensis* (مستعمرات بيضاء خشنة غير منتظمة الحواف تتسع بسرعة لتأخذ كل المساحات الفارغة في الطبق), حضرت منها شرائح صبغت بطريقة التصبيغ البسيط بصبغة الفاكسين القاعدية وفحصت تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية على قوة 100 ×15 و 25 أي بقوة تكبير 1500 و 2500 مرة، إذ أمكن التأكد من وجود البكتريا *B.thuringiensis* من خلال وجود البروتين البلوري الذي تتميز بإنتاجه والذي يصطبغ بلون الصبغة، دون البوغ الذي يبدو شفافاً أومن خلال مشاهدة الحافظات البوغية الكاملة غير متحللة وبداخلها البوغ والبروتين البلوري.



الصورة (1) الخلايا الخضرية للبكتريا *B.t* و البروتين البلوري المصبغ باللون البنفسجي المسود (قوة تكبير 15×100 زيتية)

نقيت المستعمرات التي أثبت الفحص المجهري أنها تعود إلى *B. thuringiensis* بطريقة التخطيط عدة مرات مع فحصها في كل مرة بعد الحضن لمدة 48 ساعة على درجة 30 م للتأكد من نقاوتها ولتحديد شكل البروتين البلوري الذي تنتجه كل عزلة، وتمت زراعتها على أگار مائل يحتوي الوسط (NA) وحفظت في الثلاجة لحين إجراء مزرعة السجاد لها **[6]**.

2.3 الاختبار الحيوي للعزلات المحلية مع العزلة القياسية:

تم الحصول على يرقات حشرة الأفستيا المصنفة من قبل الأستاذ الدكتور حسام الدين محمد صالح/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد وتم تربية اليرقات في مختبر ابحاث الحشرات / قسم الوقاية/ كلية الزراعة / جامعة بغداد بوضعهن في عبوه بلاستيكية قطرها 11 سم وارتفاعها 25 سم المحتوي على الغذاء الصناعي المتكون من المواد التالية (81% جريش+12% كليسرين+6% دبس+1% خمره جافة) وخلطهن جيدا **[7] [8]** والمغطاة بقماش الململ وثبت برباط مطاطي لمنع هروب الحشرات ثم وضعت في الحاضنات على حرارة 25±2 م ورطوبة 60±5%ومدة الإضاءة (الضوء : الظلام) 16:8 **[9]** . نفذت التجربة المختبرية في مختبر ابحاث الحشرات في جامعة بغداد كلية الزراعة قسم الوقاية للمدة من 10/12/2017 الى 30/12/2017 على مرحلتين وذلك باستعمال تركيزين من اللقاح البكتيري هما 1.2×10^6 بوغ/ غم من الغذاء و 1.2×10^5 بوغ/ غم غذاء حضر الأول بخلط 0.1 مل من اللقاح الأصلي (6×10^7 بوغ/ مل) مع 5 غم من الغذاء الصناعي المحضر في جو المعقم داخل غرفة العزل وحضر الثاني بإجراء تخفيف للقاح الاصلي وذلك بأخذ 0.1 مل وإضافتها إلى 0.9 مل ماء مقطر ثم أُضيف0.1 مل منه إلى طبق بتري يحتوي على5 غم من الغذاء الصناعي المعقم، تم خلط المعلق (الأبواغ والبروتين البلوري) مع الغذاء الصناعي بتقليبه داخل غرفة العزل الى أن جف ثم أضيفت إليها 10 يرقات (العمر اليرقي الاخير) من يرقات عثه التمور ثم أغلقت تم تثقيب الطبق بحيث يسمح بدخول الهواء ولا يسمح لليرقات بالهروب ثم وضعت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25 م وتم أخذ القراءات (عدد اليرقات

السليمة الباقية على قيد الحياة) بعد 4 أيام و 7 أيام و10أيام، اشتملت التجربة على 29 عزلة، وبتركيزين وكل تركيز بثلاث مكررات وقسمت التجربة على مرحلتين، أما أطباق المقارنة فقد أضيف إلى الغذاء الصناعي 0.1 مل ماء مقطر بدلاً من المعلق البوغي **[10]** .

4- التشخيص الجزيئي للعزلات المنتخبة

4.1 أستخلاص الحامض النووي DNA

أستعمل Presto Minig DNA Bacteria Kit المجهز من شركة Geneaid التايوانية في استخلاص الDNA من البكتريا *B. thuringiensis* .

4.2 تضخيم جين Cry

استعملت تقنية تفاعلات السلسلة البلمرة الأنزيمية PCR لتضخيم الجين Cry للتأكد من نوع العزلة المنتخبة باستخدام البوادئ الشائعة (Universal primer) المجهزة من شركة eurofins الالمانية كما في الجدول(1) ادناه:

البادئ	نوع البادئ	التسلسل	العدد
Cry1	**Forward**	**5-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3**	23
	Revere	**5-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3**	23
Cry9	**Forward**	**5-CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG-3**	24
	Revere	**5-GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC-3**	24

وأُجرى التضخيم بحجم 20 مايكرولتر, حيث أستعمل PreMix PCR المجهزة من شركة Bioneer

جدول (2): الظروف المعتمدة في تضخيم الجين Cry والتي تم برمجتها في جهاز PCR

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة (مْ)	الزمن (دقيقة)	عدد الدورات
1	الدنترة Denaturation	94	5	1
2	الدنترة Denaturation	94	1	30
3	ارتباط البادئ Annealing	55	1	
4	استطالة Extension	72	1:40	
5	الاستطالة النهائية Final extension	72	5	
6	التبريد Cooling	4	∞	1

بعد إنتهاء وقت التفاعل سحب 5 مايكرولتر من نواتج تضخيم الجين Cry للترحيل الكهربائي.

5- الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنواتج تقنية PCR

5.1 تحضير هلام الاكاروز Agarose

حضر الهلام بتركيز 1% وذلك بإذابة 0.5 غم من الأكاروز في 50 مل من محلولTBE buffer، وسخن بإستخدام microwave oven مدة 2 دقيقة, برد الى مايقارب 55 م° وأضيف إليه 2 مايكرولتر من صبغة Ethidium bromide.

5.2 تحضير قالب الهلام والعينة

صب الهلام بدرجة حرارة 50-55 م بقالب الترحيل الكهربائي ووضع المشط في نهاية قالب الهلام بعد أن سدت نهايتي القالب وترك لمدة نصف ساعة لكي يتصلب ثم أزيل المشط وأضيف محلول الترحيل وهو TBE buffer ليغطي سطح الهلام **[11]**. أضيفت العينات بمقدار 5 مايكرولتر من ناتج PCR وأستخدمت دلائل حجمية Ladder التي جهزت من شركة Promega, هي DNA 2000 bp لتحديد حجوم الحزم.

5.3 تشغيل الجهاز

ربطت الأقطاب وشغل جهاز الترحيل الكهربائي عند 70 ملي أمبير و90 فولت ولوحظ سريان الصبغة إلى الجهة الأخرى من الهلام، بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي وضع قالب الهلام على جهاز UV light transillminator للكشف عن الحزم البرتقالية متوهجة اللون.

5.4 التحليل الاحصائي

استعمل البرنامج **[12]**. في التحليل الاحصائي لبيانات التجربة لدراسة تأثير العوامل المختلفة (طبقت تجربة عاملية (2X29) بتصميم (CRD) عشوائي كامل لدراسة تأثير العزلات البكتيرية والتركيز والتداخل بينهما) وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD) كما استعمل اختبار مربع كاي لمقارنة الفروق المعنوية بين النسب المقربة.

6- النتائج والمناقشة

6.1 إختبار الكفاءة الحيوية على يرقات حشرة الأفستيا *Ephestia cautella*

ومن خلال احتساب مديات القتل النهائي للعزلات المختبرة على يرقات حشرة الأفستيا والبالغ عددها 28 عزلة وعزلة قياسية *B.t.k* ،يتبين أن عدد العزلات التي أحدثت نسبة قتل من 91-100 % وبالتركيز الأول والثاني بنسبة 71-80% كانت عزلة واحده وهي *B.t.k* مجموع العزلات. وتأتي بعدها العزلة المحلية1-IN التي اعطت قتل 81-90% بالتركيز الاول والثاني 61-70% وتليها العزلة المحلية NJ-1 بنسبة قتل71-80% بالتركيز الاول. اما باقي العزلات لم تحدث قتلاً عالياً إذ يتراوح بين اقل من 40%.

جدول (3): مديات القتل النهائي لمجموع 28 عزلة محلية مع عزلة قياسية مختبرة على يرقات حشرة الأفستيا.

المدى المئوي للقتل	التركيز 1.2×10^6بوغ/ مل		التركيز 1.2×10^5بوغ/ مل	
	عدد العزلات	رمز العزلة	عدد العزلات	رمز العزلة
91---100	1	*B.t.k*	0	
90 ---81	1	IN-1	0	0
80---71	1	NJ-1	1	*B.t.k*
70---61	0	0	1	IN-1
60-51	0	0	0	0
فما دون 40	26	باقي العزلات	27	باقي العزلات
P-value	0.0073 **	---	0.0066 **	---

وجد **[13]** عند إجراءه أجرى تقييم حيوي لمجموع 3408 عزلة محلية على يرقات حشرة *Spodoptera frugiperda* تعود لرتبة حرشفية الأجنحة ووجد أن 63% من هذه العزلات حققت مدى قتل من 91–100%، ولكنها نسبةٌ أعلى مما وجده **[14]** إذ وجد أن 32 عزلة فقط فعالة من مجموع 1100 عزلة محلية حصلوا عليها من الترب الكولومبية عند إجرائهم الاختبار الحيوي لها على الحشرة نفسها، وأن **[15]** ومن خلال إختبارهم 6 عزلات محلية على يرقات دودة أوراق القطن *Spodoptera littoralis* وتحت ظروف المختبر والحقل وجدا أن واحدة من هذه العزلات ذات كفاءة قتل جيدة ومن خلال متابعة الدراسة تبين أن الموت إمتد الى دور العذراء إذ حصل اختزال في عدد البالغات الخارجة من دور العذراء ولاحظا ايضاً أن البالغات الناتجة عن يرقات معاملة كانت غير خصبة أو أنها وضعت عدداً قليلاً من البيض.

صورة (2): على اليمين يرقة طبيعية للافستيا وعلى اليسار يرقة ميتة للافستيا بتكبير x10

وحصل **[10]** من خلال نتائج التقييم الحيوي لمجموع 16 عزلة من العزلات المحلية تم اختيارها في ضوء نتائج الفحص المجهري لشكل البروتين الذي تنتجه مع عزلتين قياسيتين هما *B.t.kurstaki* و *B.t.aizawai* لتقييم كفاءة القتل على يرقات دودة أوراق القطن *Spodoptera littoralis* فقد أظهر التحليل الأحصائي تفوق العزلات(NA2-1, DE1-2, DE2-3) على كافة العزلات المحلية الأخرى وكذلك على العزلات القياسية، إذ أعطت نسبة قتل عالية جداً بلغت96.6 % بإستخدام التركيز 1.2×10^6بوغ/مل ، وأن العزلة (DE2-3) اعطت نسبة قتل بلغت 93.3% بالتركيز 1.2×10^5 بوغ/مل .

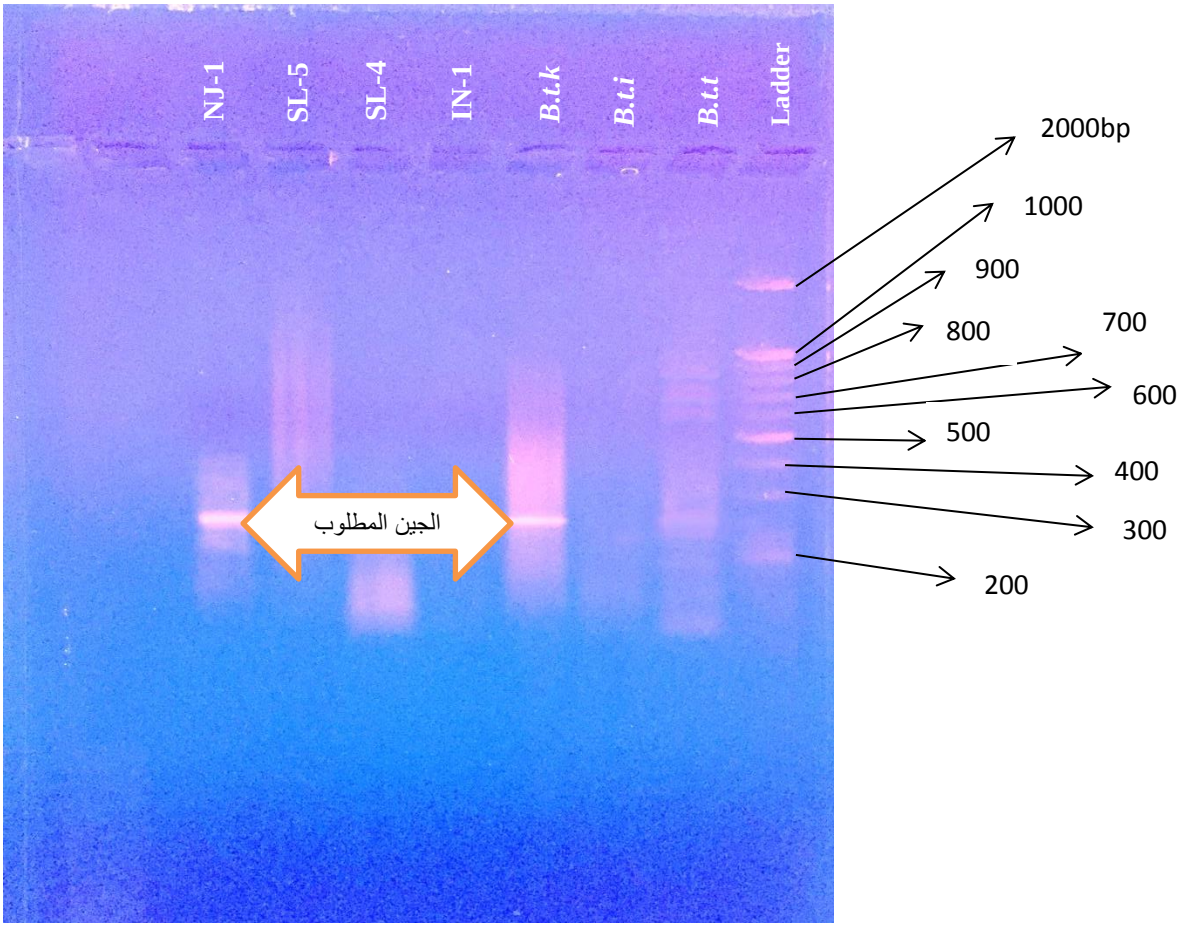
6.2 التشخيص الجيني للعزلات المنتخبة:

من خلال نتائج الاختبار الحيوي للعزلات المحلية 28 مع العزلة القياسية تم انتخاب عزلتين من 28 عزلة محلية مع مقارنتها بالعزلات القياسية وجد ان العزلتين NJ-1 و IN-1 فعالتين على حشرة الأفستيا، الاولى هي اعطت قتل 73.3% و العزلة اعطت قتل 90% وبعد عشرة ايام من المعاملة في حين ان العزلة القياسية *B.t.k* اعطت قتل 100%. وبعد اجراء تصنيف للعزلات القياسية والعزلات المحلية لنوع الجين Cry الذي جهز باستخدام خمس بوادىء اساسية لتصنيف البكتريا *B.thuringiensis* وهي Cry1 ,Cry2 ,Cry3, Cry4, (Cry9) إذ ان لكل جين فعالية ضد رتبة معينة ورتب حشرية مختلفة **[16]**. تختلف الاوزان الجزيئية لكل جين وكما موضح في الجدول(2).

الجدول (4) يوضح نوع العزلة والجين المحتمل تواجده وحجم الجين المتوقع

العزلة	الجين المحمول	حجم الجين المتوقع	المصدر
B.t.k	Cry1	(274-277) bp	**[17]**
B.t.a	Cry9	(351-354) bp	**[17]**

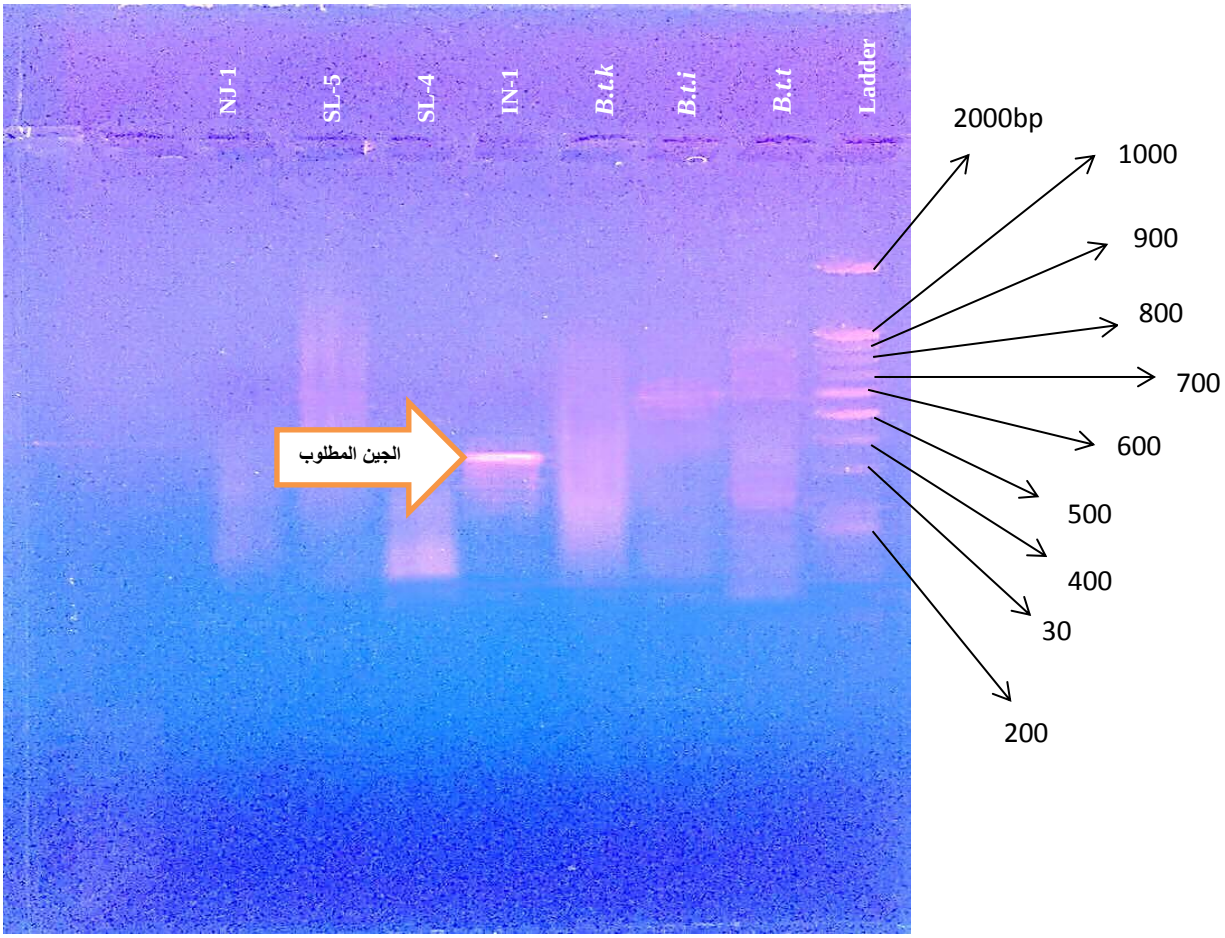
اعلاه يوضح نوع العزلة البكتيرية والجين المحتمل وجوده فيها وكذلك حجم الجين المتوقع, إذ عند استخدام البادئ Cry1 على العزلات القياسية والعزلات المحلية اعطت حزم DNA عند ترحيله على الجل الاكاروز وعند مقارنته مع Ladder كانت الحزم ما بين 260-280 bp وهما العزلتان *B.t.k* و NJ-1 وعند مقارنته اعطت الحزم نفسها التي حصل عليها الباحث **[17]** اذ حصل على 5 عزلات تحتوي على الجين Cry1, حصل **[18]** على الجين Cry1 في 10 عزلات من 17 عزله بنسبه 59% وكان حجم الجين تقريبا 130 KDa وعند قيامنا بدراسة النتائج الاختبار الحيوي للعزلات تبين ان العزلة *B.t.k* و NJ-1 اعطت نسبة قتل100% و 73.3%، حصل الباحث **[19]** على الجين Cry1Ac ذو وزن جزيئي KDa65 في العزلة القياسية *B.t.k.HD1* وحصل على الجين Cry1Aa في العزلة محلية وكان حجم الجين KDa67 وكما في الشكل التالي:



صورة (3) الترحيل الكهربائي للجين Cry1 للعزلات القياسية والمحلية

إذ كانت النتيجة متطابقة لما حصل عليه الباحث **[17]** اذ حصل على هذا الجين في 10 عزلات محليه بحجم جيني يتراوح بين 351-354 bp, وهذا يدل على ان العزلة المحلية IN-1 هي *B.t. aizawai* ، وحصل **[20]** على هذا الجين Cry9 في 45 عزلة محلية بحجم مقارب لل bp350 ، حصل**[21]** من بحث ب28 عزله محليه عن الجينات الفرعية(Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E) تابعة للجين Cry9 مع التحقق النتائج بعزلة محلية حيث ان الجين Cry9A اكثر انتشارا وحصل عليه في العزلة القياسية وكان حجم

الجينCry9 ما يقارب bp506 . وجاءت النتائج متطابقة مع ما حققه **[10]**عندما اجرى اختبار للعزلة القياسية *B.t. aizawai* على دوده اوراق القطن يرقات الطور الثالث حصل على نسبة قتل 86.7% وبعد 8ايام من المعاملة على حشرات.



صورة (4) الترحيل الكهربائي للجين Cry9 للعزلات القياسية والمحلية

7- المصادر

[1] Glazer, A.N. and Nikaido, H. microbial family tree in : Kim L ed. Advanced engineered pesticides . Now York, Basel, marcel dekker inc; pp63-71.(1995).

[2] Miller, G. Tliving in the environment (10th ed). Belmont, CA: wads worth Monsanto.2000. the whole plant. The whole season. .(1998).

[3]Apaydin, O. Isolation and characterization of *bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats. Izmir institute of technology izmir turkey. Pp94. (2004).

[4] الزبيدي، حمزه كاظم. المقاومة الحيوية للآفات، دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. العراق. 440 صفحة. (1992) .

[5]Feitelson, J.S. the *bacillus thuringiensis* family tree in: kim L ed. Advanced engineered pesticides. Now York, basel, marcel dekker inc; pp63-71.(1993).

[6]Stahly ,D.,Anderew,R.and Yousten,A. the genus Bacillus insect pathogens. It the procaryotesed. Balows, A., Truper, H., Dworkin Harder, W.and Schleifer,K.New York: Springer-Verlag .:1697-1744. .(1992).

[7] Ahmed , M.S.H.; Hameed, A.A. and Kadhum, A. A.Disinfestation of Commercially Packed Dates by a Combination Treatment. Acta Alimen. 15(3):221-226. (1986).

[8] حميد، اسعد علوان..دراسات مختبريه لإستعمال متطفل عثة التين *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera : Braconidae) في مكافحة حشرتي عثة التين *Ephestia cautella* (Walk.) ودودة جوز القطن الشوكية *Earias insulana* (Boisd.) .رسالة ماجستير . كلية الزراعة. جامعة بغداد .119صفحة. .(2002)

[9] طارق، محمد احمد ومحمد، حسام الدين عبد الله والجليلي، بسمان حسيب . التقييم الحيوي مختبرياً للفطر *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill على الاطوار المختلفة لعثة التين *Ephestia Cautella* (Walk.) (Lepidoptera: Pyralidae). مجلة جامعة كربلاء العلمية، 12 (1) :190-196. (2014).

[10] جميل, جاسر محمد. تقييم كفاءة البكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة محلياً كمبيد حيوي على الحشرات. اطروحة دكتوراه, كليه الزراعة, جامعة بغداد. (2007).

[11] Sambrook, J. and Russell, D. W. Molecular Cloning A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York, USA . . (2001).

[12] SAS. Statistical Analysis system, users guide Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Cary. N.C.USA. (2012).

[13] Fernando, H.; Valicente, M. and. Barreto, R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Neotrop. Entomol., 32(4) Londerina. (2003).

[14] Arango, J. A.; Romero, M. and Orduz, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strain from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Applied Microbiology, 92: 466. (2002).

[15] Mogahed ,M and Fedel ,M.Pathogenic efficacy of Egyptian isolates of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* under laboratoay and field condition. Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* Eds.Yu Zniu, Sun Ming and Liu Ziduo.Science Press,Beijing.Vol.3: 45. (1999).

[16] Rosas-Garcia, N.M. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*. M.S.c thesis (microbiology), M.S. University Vadodara. (2009).

[17] Cetinkaya, F.T. Isolation of *Bacillus thuringiensis* and investigation of its crystal protein genes. master of science, Biotechnology and Bioengineering, p.p 55. (2002).

[18] Burcu ŞAHİN, Bekir ÇÖL and Hatice GÜNEŞ. Bacillus thuringiensis Isolation from the Environments of Boron Mines and Effects of Boric Acid on Bioactivity. 30(1): 223-234. (2017).

[19] Raquel Camacho-Millán, Elsa Maribel Aguilar-Medina, Héctor Quezada, Óscar Medina-Contreras, Genaro Patiˆno-López, Héctor Manuel Cárdenas-Cota and Rosalío Ramos-Payán Characterization of Cry toxins from autochthonous Bacillus thuringiensis isolates from Mexico. 74(3):193-199. .(2017).

[20] Zothansanga, Lalhmachhuani, N. Senthil Kumar and G. Gurusubramanian PCR pathotyping of native Bacillus thuringiensis from Mizoram, India. Sci Vis 11 (3), 171-176. (2011).

[21] Wagh D.S., Moharil M.P. and Mahure B.V. Distribution of cry9 family members in local *Bacillus thuringiensis* isolates from Western India (Vidarbha region). PP 45-55. .(2014).