XÁC ĐỊNH GEN Vip3A TRONG VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ ĐỘC TÍNH GÂY BỆNH ĐỐI VỚI CÔN TRÙNG GÂY HẠI

Identification of Vip3A Gene *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki on Polymerase Chain Reaction (PCR) and Toxicity on Harmful Insects

Dương Kim Hà[1], Trương Phước Thiên Hoàng[2], Trần Thị Kim Oanh[2], Trần Thị Hồng Nhung[2] và Lê Đình Đôn[2]

Ngày nhận bài: 24.6.2019 *Ngày chấp nhận: 08.7.2019*

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is a positive Gram, spore-forming bacterium that synthesizes parasporal crystalline inclusions that containing *Cry* and *Cyt* proteins, some of which are toxic in against a wide range of insect orders, nematodes and human-cancer cells, These toxins have been successfully used as bioinsecticides against caterpillars, beetles and flies, including mosquitoes and blackflies. *Bt* also synthesizes insecticidal proteins during the vegetative growth phase, which are subsequently secreted into the growth medium. These proteins are commonly known as vegetative insecticidal proteins (Vips) and hold insecticidal activity against *lepidopteran, coleopteran* and some homopteran pests. Therefore, it is important and necessary to isolate and indentify toxic gens, especially is Vip gene. So we performed present of vip3A gen in *Bacillus thuringiensis* based on Vip3A primers. 10 type *Bacillus thuringiensis* strains isolated from different regions in Viet Nam were stained Gram, test presence of spores and crystal. After that, process SDS-PAGE with 5 in 10 type can create crystal : VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 and VBt27510.2. As a result, all of them have protein with 66 kDa. However, we unassertive this is Vip3A protein. To be sure that is Vip3A protein, conducted PCR with 10 type and 1 positive control. Size PCR product approximately 3.4 kb and homological with positive control. Some of Bt isolates containing Vip3A protein showed an effect on Armyworm (*Spodoptera exigua)* and Diamondback moth (*Plutella xylostella*) in laboratory tests.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; Vip3A protein. *Spodoptera exigue, Plutella xylostella,*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Với sự phát triển của công nghệ gen, nhiều nghiên cứu cho thấy *Bacillus thuringiensis* có thể được tìm thấy ở nhiều môi trường khác nhau như trong đất, ở một số cây hạt trần, trên thuốc lá khô, bụi sản phẩm tồn trữ, hạt giống, đất nông nghiệp và môi trường thủy sản, các trầm tích biển và từ các mẫu đất bị nhiễm chất thải (Martin và Travers, 1989; Smith và Couche, 1991; Ben – Dov và ctv, 1997; Iriarte và ctv, 1998; Baig và Mehnaz, 2010, Oves và ctv, 2013) Đã có 27.000 mẫu Bt được phân lập trên toàn thế giới, điều đó chứng tỏ rằng *Bt* có thể được phân lập từ những nguồn khác nhau và thậm chí là những vùng có điều kiện khắc nghiệt như sa mạc, biển (Travers và Martin, 1989). Trong đất, Bt tồn tại ở dạng bào tử, không nảy mầm hoặc nhân lên qua nhiều năm, nhiều Bt phân lập từ đất có thể không sinh độc tố chống lại côn trùng. Bt chiếm khoảng 0,005 - 0,5% *Bacillus* spp. phân lập trong đất (Travers và ctv, 1987). Tuy nhiên, mỗi dòng *B. thuringiensis* chỉ chứa một số nhóm gen *cry* gây độc với một số loài côn trùng nhất định. Việc xác định các chủng *B. thuringiensis* có chứa nhóm gen *cry* mong muốn, tạo dòng và xác định trình tự gen độc tố đó là vấn đề rất cần thiết.

Bên cạnh đó, hiệu quả diệt sâu hại dựa vào protein độc tính dạng tinh thể c*ry, cyt*, và Bt cũng sản sinh các loại protein diệt côn trùng khác gọi là Vip (Vegetative Insecticidal Protein - protein diệt côn trùng thực vật) (Abdelkefi-Mesrati và ctv, 2011; Abdelmalek và ctv, 2016; Leopoldo Palma, 2017; Estruch, 1996). Protein Vip được tổng hợp bởi gene chuyên biệt trong giai đoạn sinh trưởng và phát triển của *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki (Btk).*

1. Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản Thành phố Hồ Chí Minh
2. Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

Kết quả nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp và cấu trúc chức năng các gene mã hóa tương ứng, đã thúc đẩy công nghệ sản xuất Btk chứa bào tử, protein độc tính của những dòng Btk bản địa và Btk được can thiệp di truyền, cũng như khai thác Btk để tạo chế phẩm tốt, yếu tố quan trọng nhất là dòng vi khuẩn *Btk* được đưa vào phải có khả năng tạo độc tố có độc lực cao. Một trong nhưng độc tố cao nhất của vi khuẩn *Btk* là nội độc tố được quy định bởi đoạn gen Vip3 chiếm 67,4 % trong 1789 mẫu đất chứa 2134 chủng *Bacillus thuringiensis* (Yu và ctv, 2011)

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập Vip3A của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Phân tích 10 mẫu là các mẫu khuẩn lạc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được chọn lọc từ những mẫu được xác định có sự xuất hiện tinh thể độc và 1 mẫu đối chứng dương là *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* do Boonhiang Promdonkoy (BIOTEC Thái Lan) cung cấp, các mẫu được thu thập từ các tỉnh Vĩnh Phúc, Bến Tre, Lâm Đồng và Tiền Giang (Bảng 1).

Bảng 1. Địa điểm thu mẫu và ký hiệu mẫu

Nguồn gốc mẫu	Vĩ độ	Kinh độ	Ký hiệu mẫu
Đạo Đức, Bình Xuyên, tỉnh Vĩnh Phúc	$21^0$15'16,1''	$105^0$39'59,0''	VBt2119.1
Thị xã Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc	$21^0$13'40,6''	$105^0$42'48,0''	VBt21110.1
Hậu Thành, Cái Bè, tỉnh Tiền Giang	$10^0$23'05"	$105^0$59'57"	VBt2735.1
Hậu Thành, Cái Bè, Tiền Giang	$10^0$23'05"	$105^0$59'57"	VBt2736.2
Thạnh Trị, Bình Đại, tỉnh Bến Tre	$10^0$8'40,1''	$106^0$38'12,5''	VBt27510.2
Bình Thành, Giồng Trôm	$10^0$8'35,5''	$106^0$32'33,8''	VBt2751.2
Bình Thành, Giồng Trôm	$10^0$8'35,5''	$106^0$32'33,8''	VBt2751.3
Hồ lắng, Hồ Xuân Hương, Lâm Đồng	$11^0$57'04.6"	$108^0$27'07.6"	VBt26313.2
Phường 4, Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng	$11^0$54'46"	$108^0$25'12"	VBt26311.1
Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng	$11^0$47'41.1"	$108^0$24'22.6"	VBt26323.1

Ghi chú ký hiệu mẫu: VBt2751.2 (số 275 - mã vùng điện thoại của Bến Tre; số 1 - mẫu số 1; số 2: dòng số 2).

Các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* sau khi chọn lọc, tiến hành nuôi cấy trên môi trường LB lỏng ở 30°C và lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ và bảo quản trong glycerol 50% (-20°C) (Traver và ctv, 1987).

Trình tự cặp prime để xác định gen Vip3A vi khuẩn *Bacillus thuringiensi* var. *kurstakis* Fw/Rv 5' – CAT ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA A – 3' và 5' – CTC GAG TTA CTT AAT AGA GAC ATC GGA – 3' với kích thước 28 bp/27 bp (Abdelkefi-Merrati và ctv, 2005)

Thành phần hóa chất cho một phản ứng PCR: Nước tính khiết 136 µl, 10x PCR buffer + 25 mM $MgCl_2$ 26 µl, dNTP mixture (2mM) 26 µl, Forward primer (10 nM) 26 µl, Reverseprimer (10 nM) 26 µl, Taq DNA polymerase (3 – 5 units/µl) 6,5 µl (Kavitar Nair và ctv, 2018).

Bảng 2. Thành phần hóa chất trong gel polyacrylamide

Thành phần	Gel tách 12%	Gel gom 4%
Nước cất	2,24 ml	1,785 ml
Bis:acrylamide(29:1)	2,8ml	402 µl
Tris 8.8	1,82ml	
Tris 6.8	-	750 µl
SDS 10%	70 µl	30 µl
APS	70 µl	30 µl
TEMED	7 µl	3 µl
Tổng	7 ml	1 ml

Chu kỳ phản ứng PCR: 95^0C trong 90 giây, 94^0C trong 30 giây, 45^0C trong 30 giây, 72^0C trong 90 giây 24 chu kỳ, 72 ^{0}C trong 420 giây, giữ lạnh ở 4 ^{0}C.

Kỹ thuật SDS-PAGE (Abdelkefi-Merrati và ctv, 2005): Ly trích protein tổng số: Tăng sinh các giống có khả năng sinh tinh thể trong môi trường LB lỏng, lắc qua đêm ở 37 ^{0}C trong 16 - 18 tiếng.

Chuẩn bị gel SDS-polyacrylamide: gel tách 12% và gel gom 4% cho quá trình điện di. Thành phần hóa chất và thể tích các chất trong gel polyacrylamide (bảng 2)

Chạy SDS – PAGE ở dòng điện 100 – 120 V, khoảng 3 giờ, Nhuộm và rửa nhuộm**:** Fixing: 50% ehanol + 10% acid acetic + 40% nước. Staning : 0.1% Commassie BR250 + fixing solution**.** Destaning: 40% ethanol + 10% acid acetic +50% nước.

2.2 Thử hoạt tính diệt sâu non *Spodoptera exigua* và *Plutella xylostella*

Chọn một số dòng Bt sinh tinh thể, có Vip3A thử nghiệm trên sâu xanh da láng và sâu tơ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Dòng Bt nuôi nhân trong môi trường T3 lỏng ở 30°C, lắc 150 vòng/phút sau 40 giờ, xử lý mẫu ở 70°C trong 10 phút, pha loãng nồng độ 10^9 cfu/ml, phun trực tiếp lên nguồn thức ăn và thức ăn được thay thế 2 lần trong ngày, đối chứng phun nước khử trùng.

Sâu được nuôi thuần 3 vòng đời trong phòng thí nghiệm bằng thức ăn lá cải xanh, chọn sâu non tuổi 2 cho thử nghiệm độc tính của Bt, tiến hành 3 lần lặp lại, với 30 sâu cho 1 lần thử nghiệm.

Theo dõi sâu chết sau 1, 3, 5 và 7 ngày xử lý; Tính hiệu lực diệt sâu theo công thức Abbott:

$$A\ (\%) = 1 - \frac{T}{C} \times 100.$$

Trong đó: A (%): Hiệu lực diệt sâu;

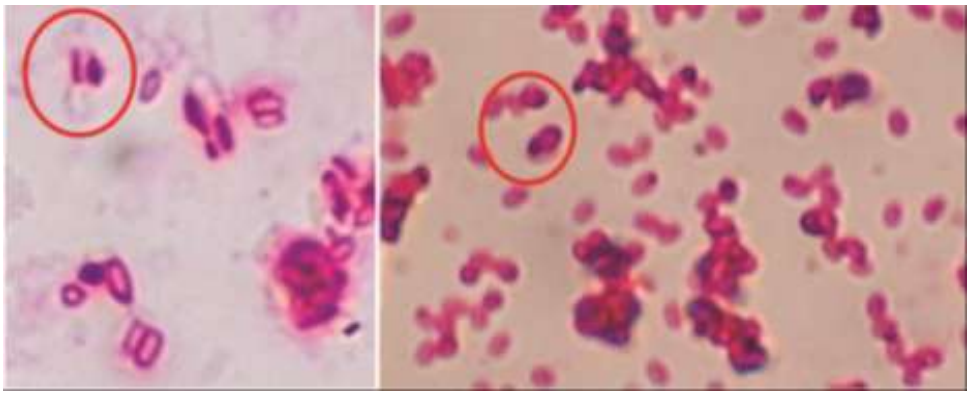
C: Số sâu sống ở lô đối chứng; T: Số sâu sống ở lô thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

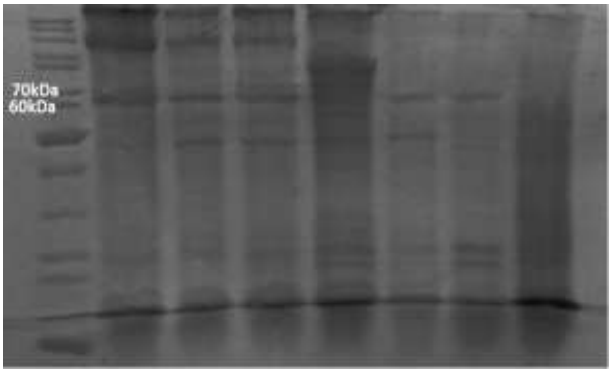
3.1 Sự hiện diện của protein Vip3A

Từ những khuẩn lạc đơn thuần tiến hành xác định đặc điểm sinh hóa của khuẩn lạc như sự phát triển của vi khuẩn trên môi trường Sabouraud dextrose (Difco) pH 9,6; Thử Gram bằng KOH 3%; Nhuộm Gram; Nhuộm bào từ; Thử hoạt tính Catalase; Phản ứng thủy phân tinh bột; Phản ứng V.P (Voges – Proskauer) và đo kích thước tế bào vi khuẩn. Tiến hành thử nghiệm sinh hóa 10 dòng vi khuẩn thu thập với các đặc điểm giống nhau như: vi khuẩn có hình que, Gram dương, sinh bào tử, catalase dương tính, có khả năng thủy phân tinh bột, phản ứng V.P dương tính. Theo Bergey (1994), các dòng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus* spp. và là một trong số những loài: *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformic*, *B. alvei*, *B. coagulans*. Ngoài sự giống nhau về đặc điểm sinh hóa, các dòng vi khuẩn này có đặc điểm khuẩn lạc tương đồng như: màu trắng đục hoặc hồng nhạt, viền nhăn, bề mặt phẳng, khô, kích thước khuẩn lạc lớn (3 – 12 mm). Tiến hành đo kích thước của các dòng vi khuẩn bằng kính hiển vi quang học vật kính 100X (có giọt dầu soi kính), theo khóa phân loại vi khuẩn của Bergey (1994), những dòng vi khuẩn *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. cereus* có chiều rộng tế bào lớn hơn hoặc bằng 1 µm. So sánh với khóa phân loại của Bergey, 10 dòng vi khuẩn trên có khả năng là *Bacillus thuringiensis*

Tiến hành nuôi cấy 10 dòng vi khuẩn trên môi trường LB rắn trong 72 – 96 giờ, sau đó tiến hành nhuộm bào tử và tinh thể. Kết quả cho thấy, tất cả các dòng đều có sự xuất hiện bào tử, tuy nhiên chỉ có 5 trong 10 dòng có khả năng tạo tinh thể (VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 và VBt27510.2) và các dòng này đều cho tinh thể dạng hình thoi (hình 2.1). Chọn các giống có khả năng tạo tinh thể hình thoi để tiến hành thí nghiệm SDS-PAGE, chủng đối chứng dương và mẫu đối chứng âm là dịch môi trường nuôi cấy trong quá trình tăng sinh sau khi ly tâm thu tế bào vi khuẩn. Vì Vip3A là một protein nội độc tố (Lee và ctv, 2003) nên có thể lấy dịch tăng sinh sau khi ly tâm làm đối chứng âm. Kết quả của quá trình SDS-PAGE được thể hiện trong hình 2.



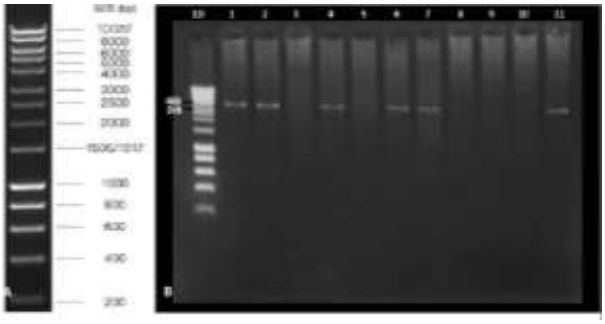
Hình 1. Tinh thể độc quan sát dưới kính hiển vi.
Ghi chú; (A) tinh thể độc hình thoi, (B) bào tử bắt vòng ngoài màu đỏ, (C) tinh thể độc hình cầu.



Hình 2. Kết quả SDS-PAGE
Ghi chú: 1: Đối chứng dương; 2: dòng VBt2119.1; 3: dòng VBt21110.1; 4: dòng VBt2735.1; 5: dòng VBt2736.2; 6: dòng VBtT10.2; 7: đối chứng âm; LD: thang protein chuẩn 10 – 200 kDa. (Promega)

Qua tiến hành thí nghiệm SDS-PAGEcác dòng tạo tinh thể hình thoi (VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 và VBt27510.2) đều có sự xuất hiện của protein kích thước 66 kDa.

Sử dụng cặp mồi Vip3A được lựa chọn và thiết kế để khuếch đại trình tự gen Vip3A, các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên hình 3 cho thấy có 6 mẫu (trong đó có đối chứng dương) có sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 3,4 kb và chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất và không có sản phẩm phụ, sản phẩm PCR ở 6 mẫu có sự tương đồng về kích thước sản phẩm PCR. Các dòng không sinh tinh thể đều không cho sản phẩm ở phản ứng PCR. Điều này chứng minh khả năng sinh tinh thể độc có liên quan mật với sự hiện diện của các gen gây độc nói chung và gen Vip3A nói riêng



Hình 3. Kết quả phản ứng PCR vùng gen Vip-3A
A) thang chuẩn hyper lader 1kb
B) kết quả PCR vùng gen Vip3A
Giếng1: VBt2119.1; giếng 2: VBt21110.1; giếng 3: VBt2751.3; giếng 4: VBt27510.2; giếng 5: VBt2736.2; giếng 6: VBt2735.1; giếng7: VBt2751.2; giếng 8: VBt26313.2; giếng 9: VBt26311.1; giếng 10: VBt26323.1; giếng 11: đối chứng dương.

Kích thước sản phẩm của các mẫu ở giếng số 1, 2, 4, 6, 7 so với đối chứng dương ở giếng số 11 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* đã được chứng minh là mang gen Vip3A, có thể khẳng định rằng các mẫu VBt2119.1; VBt21110.1; VBt2735.1; VBt2736.2 và VBt27510.2 đều có gen Vip3A mã hóa cho protein độc tố Vip3A.

So với các gen gây độc khác như *Cry* hay *Cyt*, Vip3A có phổ kháng sâu bệnh và côn trùng rộng hơn. Bên cạnh đó, Vip3A còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng sâu bệnh và côn trùng ít nhạy cảm với các gen *Cry* như *Cry1* hoặc *Cry2 (*Estruch và ctv, 1996; Lee và ctv, 2003). Yu và ctv (2011) đã phân lập 1789 mẫu đất chứa 2134 chủng *Bacillus thuringiensis* tạo được 3 gen *vip*.

Vip3 (67,4%), *vip2* (14,6%), *vip1* (8,1%), trong đó gen *vip* đang được nghiên cứu trong chế phẩm sinh học. Gen Vip3A là một gen rất được quan tâm trên thế giới, theo Boonhiang Promdonkoy - BIOTEC Thái Lan, việc nghiên cứu gen Vip đang được nghiên cứu ngày càng nhiều tại Thái Lan trong việc tạo ra chế phẩm sinh học. Tuy nhiên tại Việt Nam, gen Vip ít được tập trung nghiên cứu hơn so với các gen *Cry* hay *Cyt*. Những đặc tính của Vip3A mở ra khả năng ứng dụng cao trong việc sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh có nguồn gốc từ *Bt* dựa trên một số lượng lớn các loài gây hại trên cây trồng hiện nay (Leopoldo Palma, 2014).

3.2 Thử hoạt tính trên sâu hại trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 3 và 4 cho thấy sau một ngày sau xử lý, số sâu ở các công thức có dấu hiệu nhiễm bệnh và sâu chết tăng dần từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 sau xử lý. Đến ngày thứ 7 sau xử lý, các dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu từ 65 - 75% đối với sâu xanh da láng và 75 - 82,5% đối với sâu tơ, trong đó dòng VBt2119.1, VBt2736.2 với hiệu lực diệt sâu đạt trên 80%. Kết quả thử nghiệm sinh học qua thử nghiệm hoạt tính diệt sâu của 10 chủng *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* phân lập có tinh thể hình quả trám, trong đó 9/10 chủng có hoạt tính diệt 90 - 100 % đối với sâu *Plutella xylostella* và sâu keo *Spodoptera exigua* (Bùi Thị Hương và ctv, 2005). Theo Ngô Đình Bính và ctv (2005) xác định 127 dòng Bt diệt được *Plutella xylostella*, củng cố cho kết quả nghiên cứu nhằm tiếp tục sàng lọc và tuyển chọn dòng Bt phục vụ cho chương trình phòng trừ sâu hại bằng tác nhân sinh học.

Bảng 3. Hiệu lực diệt *Spodoptera exigua* của Bt có sự hiện diện Vip3A

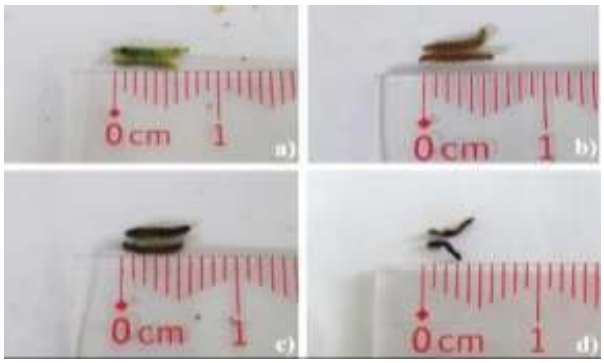
NT	1 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt2119.1	27,5	37,5	67,5	70,0
VBt21110.1	15,0	47,5	65,0	72,5
VBt2736.2	25,0	35,0	65,0	75,0
VBt2735.1	22,5	47,5	65,0	75,0
VBt27510	15,0	32,5	55,0	65,0

NSXL: ngày sau xử lý

Bảng 4. Hiệu lực diệt *Plutella xylostella* của Bt có sự hiện diện Vip3A

NT	1 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt2119.1	25,0	40,0	75,0	82,5
VBt21110.1	32,5	50,0	70,0	77,5
VBt2736.2	30,0	50,0	72,5	80,0
VBt2735.1	22,5	35,0	67,5	77,5
VBt27510	20,0	35,0	62,5	75,0

NSXL: ngày sau xử lý



Hình 4. Sâu chết do vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* qua các giai đoạn

Ghi chú: (a) Sau 12 giờ; (b) Sau 24 giờ; (c) Sau 48 giờ; (d) Sau 72 giờ.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được 5 trong số 10 dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* thu thập từ 3 tỉnh Vĩnh Phúc (VBt2119.1, VBt21110.1), Tiền Giang (VBt2735.1, VBt2736.2) và Bến Tre (VBt27510.2) có sự hiện diện của protein nội độc tố Vip3A. Các dòng Bt được xác định có mang gen Vip3A có khả năng diệt sâu keo da láng (*Spodoptera exigua)* và sâu tơ (*Plutella xylostella*) ở thí nghiệm trong phòng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdelkefi-Mesrati L., Tounsi S., Jaoua S., 2005. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. FEMS Microbiol. Lett. 244, 353–358.

2. Abdelkefi-Mesrati L., Boukedi H., Chakroun M., Kamoun F., Azzouz H., Tounsi S., *et al*. ., 2011. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. J. Invertebr. Pathol. 107, 198–201. 10.1016/j.jip.2011.05. 014[PubMed] [CrossRef]

3. Abdelmalek N., Sellami S., Ben Kridis A., Tounsi S., Rouis S., 2016. Molecular characterisation of *Bacillus thuringiensis* strain MEB4 highly toxic to the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (*Lepidoptera: Pyralidae*). Pest Manag. Sci. 72, 913–921. 10.1002/ps.4066 [PubMed] [CrossRef]

4. Ben-Dov EQ, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sina R, Manasherob R., 1997. *Extended screening by PCR for seven cry group genes from field collected strains of Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 63: 4883 – 4890.

5. Baig D.N and S. Mehnaz, 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophile *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiological Research* 165: 376 – 383

6. Bùi Thị Hương và cộng sự. *Phân lập các chủng Bacillus thuringiensis var kurstaki ở Việt Nam*. <http://tailieu.vn/doc/bao-cao-khoa-hoc-phan-lap-cac-chung-bacillus-thuringiensis-kurstaki-o-viet-nam--709184.html>

7. Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5389-5394

8. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N. and J.S. Chen, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of *Cry1Ab* delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 69(8): 46-57.

9. Leopoldo Palma, David J. Scott, Gemma Harris, Salah-Ud Din, Thomas L. Williams, Oliver J. Roberts, Mark T. Young, Primitivo Caballero and Colin Berry 5, 2017. The Vip3Ag4 Insecticidal Protoxin from *Bacillus thuringiensis* Adopts A Tetrameric Configuration That Is Maintained on Proteolysis. *Journal of Toxins* 2017, *9*, 165

10. Martin Paw and Travers RS, 1989. Worldwide abundance and distribution of Bacillus thuringiensis isolates. *Appl Environ Microbiol* 55: 2437 – 2442.

11. Ngo Dinh Binh, Nguyen Xuan Canh, Nguyen Thi Anh Nguyet, Nguyen Dinh Tuan, Pham Kieu Thuy, Nguyen Thi Thanh Hanh, Asano, S., and M. Ohba, 2005. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains in the Vietnam *Bacillus thuringiensis* collection. Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact, Victoria, BC, Canada, 30 October - 3 November, 2005 pp.126-130 ref.10

12. Oves, S. and Y. I. Shethna, 2013. Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. *J.Biosci*., 2:321– 328.

13. Smith, R. A. Coache, G. A., 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied Environmental Microbiology,* 57, 311 – 331.

14. Travers R.S., Martin P.A., and Reichelderfer C.F., 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1263-1266.

15. Yu X., Zheng A., Zhu J., Wang S., Wang L., Deng Q.,. and Li P., 2011. Characterization of vegetative insecticidal protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Current microbiology* 62: 752-757.

Lời cám ơn

Cám ơn Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí cho nghiên cứu này. Cám ơn Tiến sĩ Boonhiang Promdonkoy (BIOTEC Thái Lan) đã cung cấp mẫu Btk và primer Vip3A cho nghiên cứu.

***Phản biện*: PGS.TS. Lê Văn Trịnh**